Iranian Journal of Pulses Research
Homepage: https://ijpr.um.ac.ir
Vol. 14, No. 1, June 2023, p. 92-111
Original Research; DOI: 10.22067/ijpr.v14i1.2208-1042

پژوهش‌های حبوبات ایران
سال(دوره) ۱۴ شمارهٔ۱، نیمهٔ اوّل ۱۴۰۲
صفحهٔ ۱۱۱-۹۲، نوع مقاله: پژوهشی

بررسی تنوع ژنوتیپ‌های عدس (*Lens culinaris* Medik.) تحت تنش یخ‌زدگی در شرایط کنترل‌شده

جعفر نباتی[1]*، احمد نظامی[2]، سیده محبوبه میرمیران[3]، محمد محمدی[4] و علیرضا حسن‌فرد[5]

۱- استادیار فیزیولوژی گیاهان زراعی، گروه بقولات پژوهشکده علوم گیاهی، دانشگاه فردوسی مشهد؛ jafarnabati@ferdowsi.um.ac.ir
۲- استاد فیزیولوژی گیاهان زراعی، گروه اگروتکنولوژی و پژوهشکده علوم گیاهی، دانشگاه فردوسی مشهد؛ nezami@um.ac.ir
۳- استادیار پژوهشی، فیزیولوژی گیاهان زراعی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان خراسان رضوی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مشهد، ایران؛ mmirmiran@yahoo.com
۴- کارشناس ارشد علوم و تکنولوژی بذر، گروه اگروتکنولوژی، دانشگاه فردوسی مشهد؛ m.mohammadi7698@gmail.com
۵- دکتری علوم علف‌های‌هرز، گروه اگروتکنولوژی، دانشگاه فردوسی مشهد؛ alireza.hasanfard@yahoo.com

تاریخ‌ها:
دریافت: ۱۴۰۱/۰۵/۲۴، **بازنگری:** ۱۴۰۱/۰۸/۳۰، **پذیرش:** ۱۴۰۱/۰۹/۱۴؛ **انتشار آنلاین مقاله:** ۱۴۰۲/۰۴/۰۱

نحوه ارجاع به مقاله:
نباتی، ج.، نظامی، ا.، میرمیران، س.م.، محمدی، م.، و حسن‌فرد، ع.ر. ۱۴۰۲. بررسی تنوع ژنوتیپ‌های عدس (*Lens culinaris* Medik.) تحت تنش یخ‌زدگی در شرایط کنترل‌شده. پژوهش‌های حبوبات ایران ۱۴(۱): ۱۱۱-۹۲.

چکیده

این مطالعه به‌منظور بررسی صفات مؤثر در تحمل به یخ‌زدگی ژنوتیپ‌های عدس، به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در شرایط کنترل‌شده در دانشگاه فردوسی مشهد در سال ۱۳۹۸ اجرا شد. عوامل موردمطالعه شامل ۱۸ ژنوتیپ عدس در چهار دمای یخ‌زدگی (صفر، ۱۵-، ۱۸- و ۲۰- درجه سانتی‌گراد) بودند. نتایج نشان داد که کاهش دما به ۱۸- و ۲۰- درجه سانتی‌گراد سبب کاهش درصد بقاء در بیشتر ژنوتیپ‌ها شد. بیشترین درصد بقاء در دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد در ژنوتیپ MLC11 مشاهده شد. هیچ‌کدام از ژنوتیپ‌های موردمطالعه قادر به تحمل دمای ۲۰-درجه سانتی‌گراد نبودند. در دمای ۱۵- درجه سانتی‌گراد ژنوتیپ‌های MLC13، MLC17، MLC70، MLC409 و MLC454 دارای بقای بالای ۸۰ درصد بودند. تجزیه به عامل‌ها نشان داد که عامل اول ۳۱/۱۲ درصد از تغییرات را با کلروفیلa، کاروتنوئیدها، نسبت Cha/Chb، کل رنگ‌دانه‌های فتوسنتزی و مهار فعالیت رادیکال آزاد DPPH و عامل دوم ۱۸/۲۸ درصد از تغییرات را با کلروفیلb، پراکسیداز، ارتفاع بوته و زیست‌توده توجیه می‌کند. با توجه به این صفات ژنوتیپ‌های MLC8، MLC13، MLC17، MLC38، MLC84، MLC286 و MLC334 به‌عنوان ژنوتیپ‌های با تحمل بالا به تنش می‌باشند. تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌ها و مقایسه میانگین گروه‌ها نشان داد که تمامی صفات به‌جز کربوهیدرات‌های محلول، پرولین، محتوای نسبی آب برگ، کاتالاز و پتانسیل اسمزی در گروه اول (MLC8، MLC11، MLC33، MLC47، MLC70، MLC84، MLC409، MLC454 و MLC472) نسبت به میانگین کل برتری داشتند. بنابراین از این ژنوتیپ‌ها به دلیل برتری از نظر بقاء می‌توان در مطالعات تکمیلی تحمل به یخ‌زدگی در شرایط مزرعه در مناطق سرد استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: پتانسیل اسمزی؛ پرولین؛ تجزیه خوشه‌ای؛ کاتالاز؛ کربوهیدرات‌های محلول

مقدمه

عدس (*Lens culinaris* Medik.) یکی از حبوبات مهم است که نقش قابل توجهی در امنیت غذایی و تغذیه در سراسر جهان دارد. دانه عدس منبع غنی از پروتئین، کربوهیدرات و مواد معدنی مانند آهن و روی است (Grusak and Coyne 2009). عدس گیاهی است دیم و نسبتاً مقاوم به خشکی (Sinha *et al*., 2018)، اما با افزایش شدت خشکی عملکرد آن به طور قابل ملاحظه‌ای کاهش می‌یابد. از جمله راه‌کارهای

* **نویسنده مسئول:** jafarnabati@ferdowsi.um.ac.ir

کاهش اثرات تنش خشکی تطبیق فصل رشد با بارندگی‌های فصلی است؛ بنابراین کشت پاییزه گیاهان از جمله عدس می‌تواند در کاهش اثرات تنش خشکی موثر باشد. از طرفی حساسیت به سرما استفاده از عدس را به عنوان محصول پاییزه-زمستانه در مناطق مرتفع معتدل محدود می‌کند. مطالعاتی انجام شده جهت شناسایی ژرم پلاسم متحمل به سرما حاکی از امکان کشت عدس در پاییز است (Asghar *et al.*, 2021). با این حال، ژنتیک مقاومت در زمستان در عدس به خوبی شناخته نشده است. شناسایی عوامل ژنتیکی که به بقاء در زمستان کمک می‌کند، برای کشت زمستانه عدس بسیار مهم است.

دمای پایین پراکنش، رشد و عملکرد گیاهان را به‌طور قابل توجهی محدود کرده و تغییراتی در فتوسنتز، متابولیسم کربوهیدرات‌ها، سنتز پلی‌آمین‌ها، حذف گونه‌های فعال اکسیژن، تاخوردگی پروتئین، پایداری ساختار سلول و تراوایی غشاء ایجاد می‌کند (Kosova *et al.*, 2018). قرار گرفتن گیاهان در دمای پایین اما بدون یخزدگی تحت عنوان فرآیند خوسرمایی، درنهایت منجر به افزایش تحمل به سرما می‌شود (Furtauer *et al.*, 2019). خوسرمایی با ایجاد تغییرات فیزیولوژیکی و مولکولی نظیر تولید اسمولیت‌های تنظیم‌کننده اسمزی، تجمع آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی نظیر پرولین، گلایسین بتائین، قندها، پلی فنول، گلوتاتیون و آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی نظیر سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و گایاکول پراکسیداز سبب حذف گونه‌های فعال اکسیژن تولید شده در اثر تنش سرما می‌شود (Banerjee and Roychoudhury, 2018). این تغییرات سبب فعال شدن مسیرهای بیان ژن شده که یکی از این مسیرها، مسیر فنل پروپانوئید می‌باشد. گیاهان از طریق فعال شدن مسیر فنیل پروپانوئید، افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و تنظیم بیان ژن با سرما مقابله می‌کنند. در گیاهان خوسرما شده، آنزیم‌های اکسیدانی نظیر آسکوربات پراکسیداز و ترکیب‌های فنلی نقش مهمی در تحمل به سرما و جلوگیری از کاهش رشد آن ایفا می‌کنند (Paldi *et al.*, 2014). تحت این شرایط افزایش در بیان ژن‌های فنیل آلانین آمینولیاز، سنامیل الکل دهیدروژناز و کالاکاس در ژنوتیپ‌های مقاوم به سرمای نخود (*Cicer arietinum* L.) و ژن *CBFl* در یونجه (*Medicago sativa* L.) مشاهده شده است (Zhou *et al.*, 2018; Khaledian *et al.*, 2015)؛ بنابراین اندازه‌گیری این آنزیم‌ها در شرایط تنش سرما می‌تواند به‌عنوان شاخصی جهت ارزیابی تحمل به سرما مورد استفاده قرار گیرد (Ali and McNear, 2014). بین ارقام نخود از لحاظ تحمل به سرما و تولید ترکیب‌های فنلی در مواجه با آن تفاوت وجود دارد. خوسرمایی سبب افزایش ۱۳/۳ درصدی محتوای فنل در مقایسه با شاهد شد. درصورتی‌که در شرایط عدم خوسرمایی تولید ترکیب‌های فنلی ۲۹ درصد کمتر از شاهد بود (Khaledian *et al.*, 2015). در بروز تنش‌های شدید حذف ناکارآمد ROS ها منجر به پراکسیداسیون چربی‌های غشاء و آسیب به اندام‌های فتوسنتز کننده مانند تیلاکوئیدها می‌شود (Banerjee and Roychoudhury, 2018). بین ژنوتیپ‌های عدس از لحاظ تحمل به تنش‌های محیطی مانند سرما و همچنین ویژگی‌های بیوشیمیایی، مورفولوژیکی و عملکردی تنوع قابل ملاحظه‌ای مشاهده شده است (Nabati *et al.*, 2020a, b)؛ بنابراین شناسایی ژنوتیپ‌هایی که برای تطبیق خود با تنش و افزایش تحمل به سرما از تغییرات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی استفاده کرده و درصد بقاء و عملکرد خود را در سطح مطلوبی حفظ می‌نمایند، دارای اهمیت می‌باشد.

غشاهای سلولی اهداف اصلی آسیب انجماد ناشی از تشکیل یخ خارج سلولی هستند. تشکیل یخ خارج سلولی منجر به از دست دادن آب سلول‌ها، آب کشیدگی و انقباض سلولی شده و درنتیجه یکپارچگی غشای سلول را تحت تاثیر قرار می‌دهد. تغییر سیالیت غشاء به‌عنوان پیام‌رسانی از درک سرما در سلول شناخته می‌شود. زیرا تغییرات سیالیت منجر به باز شدن کانال‌های Ca^{+2} شده و تغییر در غلظت این یون سبب ایجاد آبشارهای پیام‌دهی مانند فعال شدن مسیر MAPKs و CRPK1 می‌شود و درنهایت تغییرات گسترده‌ای را در سطح رونویسی ایجاد می‌کند (Guo *et al*., 2018). فعال شدن این مسیرها سبب انتقال پیام سرما به هسته و فعال شدن مسیر بیان ژن CBF در سلول می‌شود (Liu *et al*., 2017). علاوه بر این کاهش دما از طریق تولید تنظیم‌کننده‌های اسمزی نظیر پرولین و کربوهیدرات‌ها سبب فعال شدن مسیر دیاسیل گلیسرول کیناز (DAGK) می‌شود که از آسیب غشا جلوگیری می‌کند (Tan *et al.*, 2018). کربوهیدرات‌ها به‌طورمستقیم بر حفظ پایداری غشای سلول در شرایط تنش سرما موثرند. کربوهیدرات‌هایی نظیر ساکاروز در تعامل با فسفات موجود در گروه‌های لیپید، سبب کاهش نفوذپذیری غشا می‌شوند (Sami *et al*., 2016).

تنش سرما کارایی فتوسنتزی گیاه را به‌دلیل خسارت به دستگاه فتوسنتزی تحت تاثیر قرار می‌دهد. در این شرایط سنتز رنگ‌دانه‌های کمکی نظیر کاروتنوئیدها و زانتوفیل جهت حفاظت از کلروپلاست در گیاه تحریک می‌شود (Banerjee and Roychoudhury, 2019). کاهش دما سبب کاهش سنتز کلروفیل و جلوگیری از تجمع آن در گیاهچه‌های برنج (*Oryza sativa* L.) شد. این کاهش درنتیجه مهار فعالیت آنزیم‌های

بیوسنتزکننده کلروفیل، نظیر اسید آمینولولینیک (ALA) و جلوگیری از تبدیل پروتوکلروفیلید (Pchlide) به کلروفیل صورت گرفت (Zhao *et al.*, 2020). میزان مالون‌دی‌آلدئید نشان دهنده میزان تخریب غشاهای سلولی است. این ترکیب تحت تاثیر تخریب و پراکسیده شدن غشای سلولی آزاد می‌شود. افزایش در محتوای مالون‌دی‌آلدئید و کاهش در سنتز کلروفیل در نتیجه تیمار سرما مشاهده شده که این امر می‌تواند نشان دهنده خسارت تنش در گیاهچه‌های یونجه باشد (Zhou *et al.*, 2018). کاهش دما سبب افزایش گونه‌های فعال اکسیژن نظیر پراکسیدهیدروژن و افزایش محتوای مالون‌دی‌آلدئید شد که این افزایش در ارقام حساس بیشتر از ارقام متحمل بود. افزایش پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء، سبب افزایش نشت الکترولیت‌ها و کاهش پایداری غشای سلولی می‌شود. کاهش دما، افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کاتالاز و پراکسیداز را به‌دنبال داشت. افزایش در فعالیت کاتالاز بیشتر از پراکسیداز بود که این امر می‌تواند به‌دلیل فعالیت کاتالاز به‌عنوان بازدارنده اصلی در تولید پراکسیدهیدروژن در شرایط تنش سرما باشد (Valizadeh-Kamran *et al.*, 2017).

با توجه به اهمیت کشت پاییزه در مناطق سرد و مرتفع جهت استفاده از بارندگی‌های فصلی و همچنین با توجه به تنوع بین ژنوتیپ‌های عدس از لحاظ تحمل به سرما و اهمیت گیاه عدس به عنوان یک منبع دارای ارزش غذایی بالا، این بررسی به منظور شناسایی ژنوتیپ‌های متحمل به سرمای عدس انجام شد.

مواد و روش‌ها

آماده‌سازی و کاشت: این پژوهش در پاییزه و زمستان ۱۳۹۸ در شرایط کنترل شده پژوهشکده علوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد انجام شد. عوامل موردبررسی شامل ۱۸ ژنوتیپ منتخب متحمل به سرمای عدس (Nabati *et al.*, 2020b) (جدول ۱) و چهار دمای یخ‌زدگی شامل صفر، ۱۵-، ۱۸- و ۲۰- درجه سانتی‌گراد بودند.

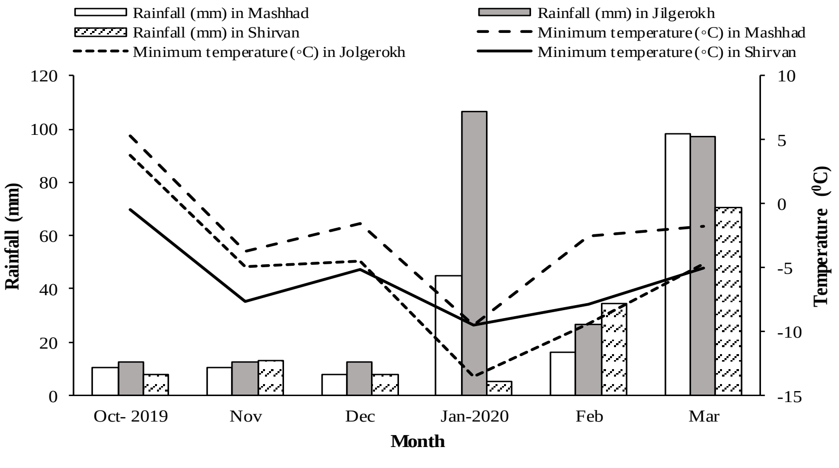
جدول ۱- ژنوتیپ‌های عدس مورد استفاده در آزمایش

Table 1. Used lentil genotypes in experiment

شماره No.	ژنوتیپ Genotype	منشاء Origin	شماره No.	ژنوتیپ Genotype	منشاء Origin
1.	MLC8[1]	Iran	10.	MLC103	Icarda(ILL5698)
2.	MLC11	Iran	11.	MLC286	Iran
3.	MLC13	Iran	12.	MLC303	Iran
4.	MLC17	Iran	13.	MLC334	Iran
5.	MLC33	Iran	14.	MLC407	Iran
6.	MLC38	Iran	15.	MLC409	Iran
7.	MLC47	Iran	16.	MLC454	Iran
8.	MLC70	Icarda(ILL7681)	17.	MLC469	Iran
9.	MLC84	Icarda(ILL7723)	18.	MLC472	Iran

MLC: کلکسیون عدس پژوهشکده علوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد، ILL: عدس لگوم بین‌المللی

MLC: Mashhad Lentil Collection, ILL: International Legume Lentil.



شکل ۱- بارندگی و متوسط دمای حداقل ماهانه در طول فصل رشد ژنوتیپ‌های عدس در شرایط کنترل شده در سال ۱۳۹۸

Fig. 1. Monthly rainfall and minimum temperature during lentil genotypes growing season under controlled condition in 2019

بذور پس از ضدعفونی در دهه دوم مهرماه به تعداد ۱۰ عدد در عمق یک سانتی‌متری گلدان‌های پلاستیکی با قطر ۱۰سانتی‌متر و ارتفاع ۱۱ سانتی‌متر حاوی ۲۵ درصد شن و ۷۵ درصد خاک مزرعه کشت شدند. آبیاری گلدان‌ها هر دو روز یک‌بار انجام شد و به‌منظور اعمال خوسرمایی گیاهان در شرایط طبیعی (شکل ۱) تا مرحله گیاهچه‌ای رشد کردند.

اعمال تیمار یخزدگی: گلدان‌ها ۲۴ ساعت قبل از اعمال تنش یخزدگی آبیاری شده و سپس برای اعمال دماهای یخزدگی در اواسط بهمن‌ماه به فریزر ترموگرادیان منتقل شدند. دمای فریزر در ابتدای آزمایش پنج درجه سانتی‌گراد بود و پس از قرار دادن نمونه‌ها با سرعت دو درجه سانتی‌گراد در ساعت دما کاهش یافت (Murry *et al.*, 1988). به‌منظور ایجاد هستک یخ در گیاه و اجتناب از بروز پدیده فرا سرما، در دمای ۳- درجه سانتی‌گراد، پاشش باکتری‌های ایجادکننده هستک یخ (INAB)[1] روی گیاه انجام شد (Wisniewski *et al.*, 2002). به‌منظور ایجاد تعادل در دمای محیط، گیاهچه‌ها در هر تیمار دمایی به مدت یک ساعت نگهداری و سپس به مدت یک شب در اتاقک سرد با دمای ۲±۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

قبل از قرارگیری نمونه‌ها در معرض دماهای یخزدگی، رنگ‌دانه‌های فتوسنتزی (Dere *et al.*, 1998)، مهار فعالیت رادیکال DPPH (Abe *et al.*, 1998)، محتوای آنتوسیانین (Wanger, 1979)، فنل کل (Singleton and Rossi, 1965)، کربوهیدرات‌های محلول (Dubois *et al.*, 1951)، مالون‌دی‌آلدئید (Heath and Parker, 1968)، پرولین (Bates *et al.*, 1973)، فعالیت کاتالاز (Velikova *et al.*, 2000)، پراکسیداز (Sreenivasulu *et al.*, 1999)، محتوای نسبی آب برگ (RWC) (Smart and Bingham, 1974) و پتانسیل اسمزی با استفاده از دستگاه اسمومتر مدل Wogel OM802.D اندازه‌گیری شد.

سه هفته پس‌از انتقال نمونه‌ها به گلخانه، درصد بقاء و بازیافت نمونه‌ها (SU%) ارزیابی شد. درصد بقاء گیاهان از طریق شمارش تعداد بوته زنده قبل (B) و پس از تنش یخزدگی (A) در هر گلدان محاسبه شد (معادله ۱).

$$SU\% = \frac{A}{B} \times 100 \quad \text{معادله (۱)}$$

همزمان ارتفاع بوته و وزن خشک گیاهان (۴۸ ساعت پس از قرار گرفتن در آون ۷۰ درجه سانتی‌گراد) اندازه‌گیری شد.

تجزیه‌وتحلیل آماری: برای تجزیه واریانس داده‌های درصدی تبدیل زاویه‌ای انجام شد و برای آزمون نرمال بودن داده‌ها و یکنواختی واریانس‌ها از نرم‌افزار، Minitab16 و برای تجزیه خوشه‌ای تجزیه به مؤلفه‌های اصلی و ترسیم نمودارهای دوبعدی از نرم‌افزارهای SPSS19 و STATISTICA استفاده گردید. برای تأیید صحت گروه‌بندی انجام شده، از تجزیه واریانس چند متغیره، تجزیه تابع تشخیص، استفاده شد. همچنین برای بررسی تفاوت گروه‌ها ازلحاظ صفات مختلف، مقایسه میانگین گروه‌ها برای صفات موردبررسی انجام شد. مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون حداقل تفاوت معنی‌دار (LSD) در سطح احتمال پنج درصد انجام گرفت.

نتایج و بحث

درصد بقاء تحت تأثیر برهمکنش ژنوتیپ‌های عدس و دماهای یخزدگی قرار گرفت (جدول ۲). تمامی ژنوتیپ‌های موردمطالعه در دمای صفر درجه سانتی‌گراد از بقای ۱۰۰ درصدی برخوردار بودند. کاهش دما به ۱۵- و سپس به ۱۸- درجه سانتی‌گراد در تمامی ژنوتیپ‌ها سبب کاهش درصد بقاء شد. تعداد ۱۴ ژنوتیپ (۷۸ درصد از ژنوتیپ‌ها) در دمای ۱۵- درجه سانتی‌گراد و دو ژنوتیپ (MLC11 و MLC47) در دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد از بقاء بالای ۵۰ درصد برخوردار بودند که این امر نشان‌دهنده پتانسیل بالای ژنوتیپ‌ها در تحمل دمای ۱۵- درجه سانتی‌گراد است. کمترین کاهش درصد بقاء درنتیجه کاهش ۱۸ درجه‌ای دما (۱۳ درصد) در ژنوتیپ MLC11 مشاهده شد. از بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه دو ژنوتیپ MLC38 و MLC472 قادر به تحمل دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد نبودند. از طرفی رسیدن دما به ۲۰- درجه سانتی‌گراد سبب مرگ تمامی ژنوتیپ‌های موردمطالعه شد (جدول ۲). به‌عبارتی آستانه تحمل به یخزدگی بیشتر ژنوتیپ‌ها در حفظ بالاترین بقای خود، کمتر از ۱۸- درجه سانتی‌گراد است.

در بین ژنوتیپ‌های عدس موردمطالعه ازنظر غلظت کلروفیل‌های a، b، نسبت کلروفیل a به b و کل رنگ‌دانه‌های فتوسنتزی تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. تنها ژنوتیپ‌ها از لحاظ غلظت کاروتنوئیدها با یکدیگر متفاوت بودند و تفاوت ۲/۶ برابری بین بیشترین (MLC8) و کمترین (MLC103) غلظت کاروتنوئیدها مشاهده شد (جدول ۳). محتوای کلروفیل برگ از عوامل موثر در تعیین سرعت فتوسنتز و تولید ماده خشک در گیاه می‌باشد. تخریب کلروفیل‌ها درنتیجه پیری و بروز تنش‌های محیطی مانند تنش دمای پایین و از طریق مسیر فئوفوربیدآلفا اکسیژناز (PAO/phylobilin) صورت می‌گیرد (Kuai *et al.*, 2018). دمای پایین سبب کند شدن بازسازی

1. Ice Nucleation Active Bacteria

پروتئین D1 در مرکز واکنش فتوسیستم II، کاهش کارایی کمپلکس تجزیه آب و اختلال در زنجیره انتقال الکترون فتوسیستم II می‌شود. تعادل بین تخریب و سنتز مجدد پروتئین D1 به میزان فعالیت بازدارندگی نوری فتوسیستم II وابسته است که تنش سرما با تاثیر منفی بر بازسازی آن سبب کاهش بازده کوانتومی فتوسیستم II می‌شود (Gururani *et al.*, 2015; Choudhury *et al.*, 2017). کاهش دما تاثیر منفی بر رنگدانه‌های فتوسنتزی داشته و بین تیپ وحشی و تیپ موتانت برنج از لحاظ میزان این کاهش تفاوت معنی‌داری مشاهده شد (Lin *et al.*, 2020).

جدول ۲- تاثیر دمای یخزدگی بر درصد بقاء ژنوتیپ‌های عدس در شرایط کنترل‌شده

Table 2. Effect of freezing temperature on survival percentage of lentil genotypes under controlled conditions

ژنوتیپ	درصد بقاء Survival percentage			
	دمای یخزدگی Freezing temperature (ºC)			
Genotype	0	-15	-18	-20
[1]MLC8	100	70.0	30.7	0.00
MLC11	100	70.3	86.7	0.00
MLC13	100	81.7	7.00	0.00
MLC17	100	86.7	12.7	0.00
MLC33	100	71.3	16.7	0.00
MLC38	100	30.0	0.00	0.00
MLC47	100	68.3	67.0	0.00
MLC70	100	83.3	12.7	0.00
MLC84	100	20.7	21.0	0.00
MLC103	100	20.3	6.33	0.00
MLC286	100	69.0	22.3	0.00
MLC303	100	65.3	14.3	0.00
MLC334	100	59.7	28.0	0.00
MLC407	100	78.3	26.7	0.00
MLC409	100	90.3	34.7	0.00
MLC454	100	86.0	23.3	0.00
MLC469	100	16.3	26.3	0.00
MLC472	100	74.7	0.00	0.00
$LSD_{(0.05)}$	20.6			
منابع تغییر S.O.V	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean squares		
ژنوتیپ Genotype(G)	17	929**		
دما Temperature (T)	3	104525**		
ژنوتیپ× دما G×T	51	763**		
خطا Error	144	162		
C.V (%)	-	27.1		

۱- MLC: کلکسیون عدس مشهد. LSD حداقل تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد. **: معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد، C.V: ضریب تغییرات.

MLC: Mashhad Lentil Collection. LSD: Least significant difference, at level of 0.05. **: Significant (P≤ 0.01), C.V: Coefficient Variation.

کاروتنوئیدها بعد از کلروفیل‌ها فراوان‌ترین رنگ‌دانه فتوسنتزی موجود در طبیعت هستند که در فرآیندهای بیولوژیکی نظیر فتوسنتز، رشد و نمو (Esteban *et al.*, 2015)، پایداری غشای تیلاکوئید، سنتز هورمون‌های گیاهی ABA و استریگولاکتون، حذف گونه‌های فعال اکسیژن و تحمل به تنش‌های محیطی نقش مهمی را ایفا می‌کنند (Jia *et al.*, 2017). کاروتنوئیدها از طریق چرخه گزانتوفیل سبب مصرف اکسیژن و حفاظت از کلروفیل در مقابل فتواکسیداسیون می‌شوند. همچنین پلی‌پپتیدهای برداشت کننده نور را از گزند مولکول‌های اکسیژن فعال حفاظت نموده و می‌توانند مستقیماً اکسیژن فعال را خاموش یا غیرفعال کرده و یا به‌وسیله آن اکسید شود و به این طریق سبب کاهش گونه‌های فعال اکسیژن تولید شده در شرایط تنش سرما می‌شوند (Banerjee and Roychoudhury, 2016). هرچند در این بررسی همبستگی معنی‌داری بین درصد بقاء با غلظت کلروفیل‌های a و b، کاروتنوئیدها و کل رنگ‌دانه‌های فتوسنتزی مشاهده نشد (جدول ۷)، اما در سایر مطالعات مشاهده شد که علاوه بر وجود تنوع بین گونه‌ها و حتی واریته‌های یک گونه مشابه از لحاظ محتوای کاروتنوئیدها (Zhang *et al.*, 2015)، ژنوتیپ‌هایی که در مواجه با شرایط تنش قادر به حفظ رنگ‌دانه‌های فتوسنتزی و به‌عبارتی حفظ توان فتوسنتزی خود باشند، از بقاء و عملکرد مناسب‌تری برخوردار خواهند بود.

جدول ۳- محتوای رنگ‌دانه‌های فتوسنتزی در ژنوتیپ‌های عدس قبل از اعمال یخزدگی در شرایط کنترل‌شده

Table 3. Photosynthesis pigments contents in lentil genotypes before freezing stress under controlled condition

ژنوتیپ		کلروفیلa(میلی‌گرم بر گرم وزن تر)	کلروفیلb(میلی‌گرم بر گرم وزن تر)	کاروتنوئیدها(میلی‌گرم بر گرم وزن تر)	کلروفیل a/b	کل رنگ‌دانه‌ها (میلی‌گرم بر گرم وزن تر)
Genotype		**Cha (mg.gfw^{-1})**	**Chb (mg.gfw^{-1})**	**Carotenoieds (mg.gfw^{-1})**	**Cha/Chb**	**Total pigment (mg.gfw^{-1})**
[1]MLC8		0.564^{a}	0.264^{ab}	0.179^{a}	2.13^{ab}	1.007^{a}
MLC11		0.451^{a-c}	0.236^{a-c}	0.129^{a-d}	1.90^{a-c}	0.818^{a-c}
MLC13		0.457^{a-c}	0.256^{a-c}	0.138^{a-d}	1.78^{b-c}	0.851^{a-c}
MLC17		0.551^{ab}	0.261^{a-c}	0.170^{ab}	2.11^{ab}	0.981^{a}
MLC33		0.434^{a-c}	0.262^{a-c}	0.141^{a-d}	1.66^{bc}	0.836^{a-c}
MLC38		0.510^{a-c}	0.252^{a-c}	0.167^{ab}	2.02^{a-c}	0.929^{a-c}
MLC47		0.375^{a-c}	0.219^{bc}	0.096^{b-d}	1.71^{bc}	0.690^{a-c}
MLC70		0.501^{a-c}	0.244^{a-c}	0.129^{a-d}	2.05^{a-c}	0.875^{a-c}
MLC84		0.489^{a-c}	0.246^{a-c}	0.139^{a-d}	1.98^{a-c}	0.875^{a-c}
MLC103		0.344^{c}	0.251^{a-c}	0.068^{d}	1.36^{c}	0.664^{bc}
MLC286		0.463^{a-c}	0.256^{a-c}	0.119^{a-d}	1.81^{bc}	0.838^{a-c}
MLC303		0.329^{c}	0.216^{c}	0.087^{cd}	1.52^{bc}	0.632^{c}
MLC334		0.503^{a-c}	0.269^{a}	0.127^{a-d}	1.86^{a-c}	0.899^{a-c}
MLC407		0.509^{a-c}	0.234^{a-c}	0.139^{a-d}	2.16^{ab}	0.881^{a-c}
MLC409		0.399^{a-c}	0.260^{a-c}	0.098^{b-d}	1.53^{bc}	0.757^{a-c}
MLC454		0.583^{a}	0.231^{a-c}	0.150^{a-c}	2.52^{a}	0.964^{ab}
MLC469		0.389^{a-c}	0.225^{a-c}	0.098^{b-d}	1.73^{bc}	0.712^{a-c}
MLC472		0.443^{a-c}	0.241^{a-c}	0.112^{a-d}	1.83^{bc}	0.796^{a-c}
منابع تغییرS.O.V	درجه df آزادی			میانگین مربعاتMean squares		
ژنوتیپGenotype(G)	17	0.016^{**}	0.001^{**}	0.046^{**}	0.231^{**}	0.035**
خطاError	36	0.004	0.0002	0.023	0.046	0.009
C.V (%)	-	14.2	5.7	19.7	11.5	11.7

۱- MLC: کلکسیون عدس مشهد. LSD حداقل تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد. **: معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد، C.V: ضریب تغییرات.

MLC: Mashhad Lentil Collection. LSD: Least significant difference, at level of 0.05. **: Significant (P≤ 0.01), C.V: Coefficient Variation.

بین ژنوتیپ‌ها ازلحاظ مهار فعالیت رادیکال آزاد DPPH تفاوت معنی‌داری مشاهده شد. دامنه تغییرات مهار فعالیت رادیکال آزاد DPPH از ۰/۵۵۸ میلی‌گرم بر گرم وزن تر در ژنوتیپ MLC103 تا ۱/۱۲ میلی‌گرم بر گرم وزن تر در ژنوتیپ MLC469 متغیر بود (جدول ۴). باوجوداینکه ارتباط مثبت و معنی‌داری بین این صفت با درصد بقاء گیاهچه‌های عدس مشاهده نشد، اما ارتباط این صفت با ارتفاع بوته در طی دوره بازیابی مثبت و معنی‌دار (r^2=۰/۵۲*) بود (جدول ۷). اندازه‌گیری مهار فعالیت رادیکال آزاد DPPH، روشی ساده و ارزان جهت اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی محسوب می‌شود (Sirivibulkovit *et al.*, 2018). کاهش دما سبب افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاهچه‌های ریحان (*Ocimum basilicum* L.) در مقایسه با شاهد شد. بیشترین میزان مهار فعالیت رادیکال آزاد DPPH نیز در قرارگیری گیاهان به مدت ۱۲ ساعت در دمای چهار درجه سانتی‌گراد به‌دست آمد که افزایش ۳۵ درصدی در مقایسه با شاهد داشت (Rezaie *et al.*, 2020).

محتوای آنتوسیانین تحت تأثیر معنی‌دار ژنوتیپ‌های عدس قرار گرفت. تفاوت ۳/۷ برابری بین بیشترین (ژنوتیپ MLC472) و کمترین (ژنوتیپ MLC8) محتوای آنتوسیانین مشاهده شد (جدول ۴). در این مطالعه نیز بین محتوای آنتوسیانین و فعالیت پراکسیداز همبستگی مثبت و معنی‌دار (r^2=۰/۵۸*) وجود داشت (جدول ۷). همچنین این دو صفت همراه با پرولین در جزو اول تجزیه به مولفه‌های اصلی قرار گرفتند (شکل ۳). از طرفی بررسی درصد بقا در دمای ۱۵- درجه سانتی‌گراد در این دو ژنوتیپ نشان داد که هر دو از بقای بالای ۷۰ درصد برخوردار بودند. اما ژنوتیپ MLC472 از ۳۶ درصد محتوای پرولین بیشتر و ۲/۹ برابر پراکسیداز بالاتری در مقایسه با ژنوتیپ MLC8 برخوردار بود. به‌عبارتی ژنوتیپ MLC472 از توانایی آنتی‌اکسیدانی بالاتری در مقابله با تنش برخوردار بود.

آنتوسیانین یکی از مهم‌ترین رنگ‌دانه‌های گیاهی و متعلق به خانواده فلاونوئیدها می‌باشد. این ترکیب‌ها به‌دلیل ماهیت عمومی کمبود الکترون، میل ترکیبی بالایی جهت واکنش با اکسیژن فعال و رادیکال‌های آزاد دارند. به‌عبارتی ساختار خاص این ترکیب‌ها سبب بروز فعالیت آنتی‌اکسیدانی و افزایش تحمل گیاه در برابر تنش می‌شود. تحت شرایط دمای پایین، بیان ژن‌های مرتبط با سنتز آنتوسیانین افزایش یافته و تجمع آن

سبب بهبود تحمل گیاه در برابر تنش می‌شود (Naing *et al.*, 2018). در مسیر سنتز آنتوسیانین، چالکون سنتاز (CHS)، چالکون ایزومراز (CHI)، فلاون ۳-هیدروکسیلاز (F3H)، دهیدروفلاونول ۴-رداکتاز (DFR) و آنتوسیانین سنتاز (ANS)، آنزیم‌های اصلی در بیوسنتز این ماده محسوب می‌شوند (Liu *et al.*, 2018).

جدول ۴- مهار فعالیت رادیکال آزاد DPPH، آنتوسیانین، فنل کل و کربوهیدرات‌های محلول ژنوتیپ‌های عدس قبل از اعمال یخ‌زدگی در شرایط کنترل‌شده

Table 4. DPPH, anthocyanin, total phenol and soluble carbohydrates in lentil genotypes before freezing stress under controlled condition

ژنوتیپ		مهار فعالیت رادیکال آزاد DPPH (میلی‌گرم بر گرم وزن تر)	آنتوسیانین (میلی مول بر گرم وزن تر)	فنل کل (میلی‌گرم بر گرم وزن تر)	کربوهیدرات‌های محلول(میلی‌گرم بر گرم وزن تر)
Genotype		**DPPH ($mg.gfw^{-1}$)**	**Anthocyanin ($mmol.gfw^{-1}$)**	**Phenol ($mg.gfw^{-1}$)**	**Soluble carbohydrates ($mg.gfw^{-1}$)**
[1]MLC8		1.01[ab]	0.685[e]	126[a-c]	1.79[c]
MLC11		1.07[a]	1.29[b-e]	125[a-c]	1.80[c]
MLC13		0.931[ab]	1.22[be]	144[ab]	3.28[a]
MLC17		0.750[ab]	1.42[b-e]	116[a-c]	1.83[c]
MLC33		0.803[ab]	2.11[ab]	113[a-c]	2.22[bc]
MLC38		0.780[ab]	1.65[a-e]	109[a-c]	1.57[c]
MLC47		0.762[ab]	1.66[a-e]	155[a]	1.99[c]
MLC70		1.08[a]	1.44[b-e]	151[ab]	1.98[c]
MLC84		0.917[ab]	2.05[ab]	135[ab]	2.12[c]
MLC103		0.558[b]	0.908[d-e]	68.9[c]	3.25[ab]
MLC286		0.942[ab]	1.40[b-e]	126[a-c]	2.00[c]
MLC303		0.666[ab]	2.04[ab]	88.1[bc]	1.91[c]
MLC334		1.05[a]	1.83[a-d]	142[ab]	2.23[bc]
MLC407		1.09[a]	0.935[c-e]	149[ab]	2.10[c]
MLC409		0.999[ab]	1.97[a-c]	160[a]	3.58[a]
MLC454		1.04[a]	1.49[a-e]	112[a-c]	2.05[c]
MLC469		1.12[a]	1.57[a-e]	148[ab]	1.67[c]
MLC472		1.05[a]	2.52[a]	137[ab]	1.75[c]
منابع تغییر S.O.V	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean squares			
ژنوتیپ Genotype	17	0.089**	0.669**	1724**	1.02**
خطا Error	36	0.031	0.105	382	0.101
C.V (%)	-	15.9	20.7	15.3	14.6

۱- MLC: کلکسیون عدس مشهد. LSD حداقل تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد. **: معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد، C.V: ضریب تغییرات.

MLC: Mashhad Lentil Collection. LSD: Least significant difference, at level of 0.05. **: Significant (P≤ 0.01), C.V: Coefficient Variation.

در بین ژنوتیپ‌های موردمطالعه ازنظر فنل کل تفاوت معنی‌داری مشاهده شد. وجود تفاوت ۲/۳ برابری بین بیشترین (MLC409) و کمترین (MLC103) میزان فنل در ژنوتیپ‌های عدس نشان‌دهنده تنوع موجود در بین آن‌ها ازلحاظ تجمع ترکیب‌های فنلی بود (جدول ۴). رابطه مثبت و معنی‌دار بین میزان فنل با مهار فعالیت رادیکال آزاد DPPH (r^2=۰/۷۲**) مشاهده شد (جدول ۷).

ترکیب‌های فنلی متابولیت‌های ثانویه گیاهی هستند که تحت تاثیر تنش‌های محیطی از طریق مسیرهای پنتوزفسفات، اسید شیکمیک و فنیل پروپانوئید در بافت‌های گیاه سنتز شده و تجمع می‌یابند(Lin *et al.*, 2016). این ترکیب‌ها نقش مهمی در جلوگیری از پراکسیداسیون لیپیدهای غشا و حذف گونه‌های فعال اکسیژن دارند. تحت تنش سرما، افزایش محتوای ترکیب‌های فنلی در ژنوتیپ‌های نخود کابلی که متحمل به سرما هستند، در مقایسه با تیپ دسی مشاهده شده است (Khaledian *et al.*, 2015)؛ بنابراین اندازه‌گیری محتوای ترکیب‌های فنلی می‌تواند به‌عنوان روشی جهت تعیین توانایی گیاهان در حذف گونه‌های فعال اکسیژن و مقابله با تنش محسوب شود. در مطالعه حاضر کاهش دما از صفر به ۱۵- درجه سانتی‌گراد به‌ترتیب در ژنوتیپ‌های MLC409 و MLC103 سبب کاهش ۱۰ و ۸۰ درصدی بقاء شد. همچنین ژنوتیپ MLC409 علاوه بر تولید فنل بالاتر از ۷۹ درصد مهار فعالیت رادیکال آزاد DPPH بالاتری نیز در مقایسه با ژنوتیپ MLC103 برخوردار بود که این امر نشان دهنده توانایی بالاتر ژنوتیپ MLC409، در مهار گونه‌های فعال اکسیژن تولید شده در شرایط تنش با بهره‌مندی از یک سیستم آنتی‌اکسیدانی قوی است (جدول‌های ۲ و ۴).

بین ژنوتیپ‌های عدس از لحاظ محتوای کربوهیدرات‌های محلول تفاوت معنی‌دار مشاهده شد. دامنه تغییرات این صفت بین ۱/۵۷ میلی‌گرم بر گرم وزن تر در ژنوتیپ MLC38 تا ۳/۵۸ میلی‌گرم بر گرم وزن تر در ژنوتیپ MLC409 متغیر بود (جدول ۴).

کاهش سرعت فتوسنتز و کارایی کوانتومی فتوسیستم II با افزایش میزان کربوهیدرات‌های محلول در شرایط تنش سرما همراه بوده که این امر مربوط به نقش کربوهیدرات‌های محلول به‌عنوان تنظیم‌کننده‌های اسمزی در افزایش تحمل به تنش می‌باشد (Hajihashemi *et al.*, 2018). در ژنوتیپ MLC38 کاهش دما از صفر به ۱۵- درجه سانتی‌گراد منجر به کاهش حدود ۷۰ درصدی بقاء شد، در صورتی‌که تنها ۱۰ درصد کاهش بقاء در ژنوتیپ MLC409 مشاهده شد. همچنین ژنوتیپ MLC38 قادر به تحمل دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد نیز نبود. به‌عبارتی ژنوتیپ‌های متحمل به تنش قادرند از طریق تولید اسمولیت‌های سازگار نظیر کربوهیدرات‌های محلول و انجام تنظیم اسمزی، سبب حذف گونه‌های فعال اکسیژن و محافظت از ساختار غشاهای سلولی شده و به این طریق اثرات منفی تنش بر گیاه را کاهش دهند (جدول‌های ۲ و ۴).

نتایج نشان دهنده تفاوت معنی‌دار در محتوای مالون‌دی‌آلدئید بین ژنوتیپ‌های عدس بود. تفاوت ۵/۶ برابری بین بیشترین (ژنوتیپ MLC454) و کمترین (ژنوتیپ MLC17) مقدار آن مشاهده شد (جدول ۵). علی‌رغم اینکه مالون‌دی‌آلدئید به‌عنوان محصول پراکسیداسیون لیپیدها و شاخصی جهت تعیین خسارت ناشی از تنش اکسیداتیو محسوب شده و وجود مقادیر بالای آن نشان دهنده خسارت بیشتر به غشاهای سلولی و حساسیت بیشتر گیاه به تنش می‌باشد (Lei *et al.*, 2019)، در مطالعه حاضر ژنوتیپ MLC454 که از بیشترین محتوای مالون‌دی‌آلدئید برخوردار بود، اما توانست بقای خود را در دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد حفظ نماید.

جدول ۵- مالون‌دی‌آلدئید، پرولین، کاتالاز، پراکسیداز، محتوای نسبی آب برگ و پتانسیل اسمزی در ژنوتیپ‌های عدس قبل از اعمال یخ‌زدگی در شرایط کنترل‌شده

Table 5. MDA, proline, catalase, peroxidase, relative water content, and osmotic potential in lentil genotypes before freezing stress under controlled condition.

ژنوتیپ Genotype		مالون‌دی‌آلدئید (نانو مول بر گرم وزن تر) MDA (nmol gfw^{-1})	پرولین (میلی‌گرم بر گرم وزن تر) Proline (mg.gfw^{-1})	کاتالاز (واحد در دقیقه در گرم وزن تر) Catalase (unit min gfw^{-1})	پراکسیداز (واحد در دقیقه در گرم وزن تر) Peroxidase (unit min gfw^{-1})	محتوای نسبی آب برگ (درصد) RWC (%)	پتانسیل اسمزی (مگا پاسکال) Osmotic potential (MPa)
[1]MLC8		112^{c-f}	3.52^{bc}	1047^{e-g}	4.10^{bc}	72.3^{a-c}	-2.22^{b}
MLC11		155^{a-c}	5.26^{a-c}	1688^{d-g}	4.69^{bc}	86.3^{a}	-2.49^{ab}
MLC13		81.9^{d-g}	4.08^{a-c}	2660^{b-d}	3.67^{bc}	87.0^{a}	-2.03^{bc}
MLC17		39.3^{g}	3.60^{bc}	2051^{c-g}	4.15^{bc}	83.6^{ab}	-1.84^{bc}
MLC33		120^{c-e}	3.74^{bc}	827^{g}	5.94^{b}	71.0^{a-c}	-2.42^{b}
MLC38		126^{b-d}	2.84^{c}	2195^{c-f}	3.28^{bc}	79.3^{ab}	-2.76^{ab}
MLC47		63.6^{d-g}	4.16^{a-c}	1348^{d-g}	4.59^{bc}	71.8^{a-c}	-2.43^{b}
MLC70		93.2^{c-g}	6.13^{ab}	1000^{f-g}	3.52^{bc}	67.2^{a-c}	-2.16^{bc}
MLC84		123^{cd}	3.90^{a-c}	1062^{e-g}	4.29^{bc}	69.1^{a-c}	-2.36^{b}
MLC103		45.8^{fg}	5.40^{a-c}	3932^{b}	5.22^{bc}	53.3^{c}	-2.62^{ab}
MLC286		71.5^{d-g}	5.87^{a-c}	5777^{a}	3.78^{bc}	65.2^{bc}	-3.21^{a}
MLC303		53.1^{e-g}	7.02^{a}	2252^{c-f}	9.72^{a}	74.0^{ab}	-1.86^{bc}
MLC334		116^{c-e}	5.69^{a-c}	2344^{c-e}	5.09^{bc}	72.2^{a-c}	-3.13^{a}
MLC407		117^{c-e}	5.34^{a-c}	3256^{bc}	2.61^{c}	76.0^{ab}	-2.58^{ab}
MLC409		193^{ab}	5.10^{a-c}	1730^{d-g}	4.33^{bc}	64.8^{bc}	-2.47^{ab}
MLC454		219^{a}	2.93^{bc}	1296^{e-g}	6.04^{b}	64.3^{bc}	-2.13^{bc}
MLC469		130^{b-d}	3.60^{bc}	2210^{c-f}	9.77^{a}	71.2^{a-c}	-1.60^{c}
MLC472		127^{b-d}	4.78^{a-c}	1396^{d-g}	11.9^{a}	82.2^{ab}	-2.48^{ab}
LSD(0.05)		34.9	1.65	678	1.57		0.862
S.O.V	df	Mean squares میانگین مربعات					
ژنوتیپ Genotype	17	6894^{**}	4.17^{**}	4527808^{**}	19.1^{**}	223^{**}	0.521^{*}
خطا Error	36	445	0.989	167387	0.895	35.57	0.271
C.V (%)	-	19.1	21.6	19.3	17.6	15.6	21.9

۱- MLC: کلکسیون عدس مشهد. LSD حداقل تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد. **: معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد، C.V: ضریب تغییرات.

MLC: Mashhad Lentil Collection. LSD: Least significant difference, at level of 0.05. **: Significant (P≤ 0.01), C.V: Coefficient Variation.

احتمالاً این ژنوتیپ با بالاتر بودن مهار فعالیت رادیکال آزاد DPPH توانسته است با تولید مالون‌دی‌آلدئید و پراکسیداسیون اسیدهای چرب مقابله کرده و توانایی گیاه را جهت حفظ بقاء در دماهای ۱۵- و ۱۸- درجه سانتی‌گراد افزایش دهد. افزایش ۳۹ درصدی در مهار فعالیت رادیکال آزاد DPPH در این ژنوتیپ در مقایسه با ژنوتیپ MLC17 نیز موید این مطلب می‌باشد (جدول‌های ۲، ۴ و ۵).

دامنه تغییرات تنظیم کننده اسمزی پرولین بین ۲/۸۴ میلی‌گرم بر گرم وزن تر در ژنوتیپ MLC38 تا ۷/۰۲ میلی‌گرم بر گرم وزن تر در ژنوتیپ MLC303 متغیر بود (جدول ۵). در این بررسی بین میزان پرولین تجمع یافته در طی خوسرمایی در ژنوتیپ‌ها با درصد بقاء و صفات مربوط به رشد مجدد گیاه همبستگی مثبت و معنی‌داری مشاهده نشد (جدول ۷).

به‌طورکلی تجمع اسمولیت‌های تنظیم‌کننده اسمزی نظیر پرولین، گلایسین بتائین و آمینواسیدها نشان دهنده واکنش معمول گیاه به تنش‌های مختلف زیستی نظیر سرما می‌باشد. این ترکیب‌ها از طریق حفظ پایداری ساختار سلول سبب کاهش خسارت ناشی از تنش می‌شوند (Liu *et al.*, 2013). پرولین علاوه بر تنظیم اسمزی، به‌عنوان چپرون شیمیایی سبب حفظ ساختار پروتئین‌ها و ممانعت از تغییر شکل آن‌ها در شرایط تنش می‌شود. ساخت پرولین در کلروپلاست و سیتوپلاسم و تخریب آن در میتوکندری صورت می‌گیرد. بیوسنتز پرولین از دو مسیر اورنیتین و گلوتامات در گیاهان انجام می‌شود. تجمع آن در کلروپلاست به دلیل القای فعالیت آنزیم‌های دلتا-۱-پرولین۵-کربوکسیلات سنتاز (P5CS) و پرولین ۵- کربوکسیلات ردوکتاز (P5CR) و ممانعت از فعالیت آنزیم‌های اکسیدکننده پرولین مانند پرولین دهیدروژناز (PRODH) و پرولین ۵ -کربوکسیلات دهیدروژناز (P5CDH) صورت می‌گیرد (Szepesi and Szollosi, 2018).

در این مطالعه کاهش دما به ۱۵- درجه سانتی‌گراد سبب کاهش ۷۰ درصدی بقاء در ژنوتیپ MLC38 شد، درحالی‌که در این دما تنها ۳۵ درصد کاهش بقاء در ژنوتیپ MLC303 مشاهده شد. همچنین ژنوتیپ MLC38 قادر به تحمل دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد نبود. بررسی سایر صفات نیز نشان دهنده بالاتر بودن محتوای آنتوسیانین و کربوهیدرات‌های محلول و کمتر بودن میزان مالون‌دی‌آلدئید در ژنوتیپ MLC303 در مقایسه با ژنوتیپ MLC38 بود (جدول‌های ۲، ۴ و ۵). به‌عبارتی ژنوتیپ MLC303 از توانایی بیشتری در تولید آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی و افزایش تحمل در برابر سرما برخوردار می‌باشد.

دامنه تغییرات فعالیت آنزیم کاتالاز بین ۸۲۷ واحد در دقیقه در گرم ماده خشک در ژنوتیپ MLC33 تا ۵۷۷۷ واحد در دقیقه در گرم ماده خشک در ژنوتیپ MLC286 متغیر بود. درخصوص آنزیم پراکسیداز نیز تفاوت ۴/۶ برابری بین بیشترین (ژنوتیپ MLC472) و کمترین (ژنوتیپ MLC407) میزان فعالیت آن مشاهده شد (جدول ۵). در بررسی فعالیت آنزیم کاتالاز مشاهده شد که با وجود اینکه زنده ماندن هر دو ژنوتیپ MLC33 و MLC286 در دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد، اما ژنوتیپ MLC286 از میزان پراکسیداسیون لیپید کمتر و محتوای پرولین، مهار فعالیت رادیکال آزاد DPPH و فنل بالاتری در مقایسه با ژنوتیپ MLC33 برخوردار بود (جدول‌های ۴ و ۵). این امر حاکی از قوی‌تر بودن توان سیستم آنتی‌اکسیدانی این ژنوتیپ در مقابله با تنش است.

نتایج بررسی تنوع ژنوتیپ‌ها در فعالیت پراکسیداز نشان داد که علی‌رغم بالاتر بودن فعالیت آنزیم پراکسیداز در ژنوتیپ MLC472 در مقایسه با ژنوتیپ MLC407، اما ژنوتیپ MLC472 قادر به تحمل دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد نبوده و همچنین از محتوای رنگ‌دانه‌های فتوسنتزی، مهار فعالیت رادیکال آزاد DPPH، فنل، پرولین و کربوهیدرات‌های محلول کمتری در مقایسه با ژنوتیپ MLC407 برخوردار بود.

آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند کاتالاز و پراکسیدازها از مهم‌ترین آنزیم‌های محافظت کننده گیاه در برابر تنش‌های اکسیداتیو و جاروب کننده گونه‌های فعال اکسیژن محسوب می‌شوند. آنزیم کاتالاز در پراکسی‌زوم فعالیت داشته و از طریق تبدیل پراکسیدهیدرژن به آب و اکسیژن عمل می‌کند (Jovanovic *et al.*, 2018). افزایش در فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز تحت شرایط تنش دمایی در مقایسه با شاهد مشاهده شده است که می‌تواند نشان دهنده قرارگیری گیاه تحت تنش شدید و تولید گونه‌های فعال اکسیژن باشد (Soengas *et al.*, 2018). بروز تنش‌های شدید سبب برهم خوردن تعادل بین تولید و حذف گونه‌های فعال اکسیژن شده و تجمع آن‌ها سبب بروز خسارت سلولی، مرگ برنامه‌ریزی شده سلول و درنهایت کاهش عملکرد گیاه می‌شود (Raja *et al.*, 2017).

بین ژنوتیپ‌های موردمطالعه ازنظر محتوای نسبی آب برگ تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. ۵۶ درصد از ژنوتیپ‌ها (۱۰ ژنوتیپ) از محتوای نسبی آب برگ بالای ۷۰ درصد برخوردار بودند (جدول ۵). محتوای نسبی آب برگ، یک ویژگی فیزیولوژیکی محسوب می‌شود که حفظ آن سبب حفظ و تداوم فعالیت‌های فتوسنتزی گیاه خواهد بود. بنابراین محتوای نسبی

آب برگ بالاتر نشان دهنده توانایی بیشتر یک ژنوتیپ در حفظ مقادیر بالاتر آب برگ‌ها در مقابله با تنش است. در این بررسی تنها بین محتوای آب نسبی برگ با وزن خشک بوته در پایان دوره بازیافت همبستگی مشاهده شد (جدول ۷). به‌عبارتی محتوای آب نسبی بالاتر سبب بهبود صفات مربوط به رشد مجدد گیاه بعد از اعمال تنش می‌شود.

میزان پتانسیل اسمزی از ۱/۶۰- مگا پاسکال در ژنوتیپ MLC469 تا ۳/۲۱- مگا پاسکال در MLC286 متغیر بود (جدول ۵). گیاهان متحمل می‌توانند با تولید تنظیم‌کننده‌های اسمزی نظیر کربوهیدرات‌های محلول و پرولین سبب کاهش پتانسیل آب، حفظ غشای سلول و جاروب گونه‌های فعال اکسیژن شده و به این طریق میزان تحمل گیاه به تنش را افزایش دهند. هرچند رابطه مثبت و معنی‌داری بین میزان کربوهیدرات‌های محلول و پتانسیل اسمزی مشاهده نشد (جدول ۷). پایین‌تر بودن پتانسیل اسمزی در ژنوتیپ MLC286 نشان دهنده بیشتر بودن توانایی آن در مقابله با تنش بود. کاهش دما به ۱۵- درجه سانتی‌گراد سبب کاهش ۳۱ درصدی بقاء در این ژنوتیپ شد. درصورتی‌که در ژنوتیپ MLC469، کاهش ۸۴ درصدی در بقای آن مشاهده شد. همچنین بالاتر بودن محتوای پرولین و کربوهیدرات‌های محلول در ژنوتیپ MLC286 (جدول‌های ۲، ۴ و ۵) نیز می‌تواند تاییدی بر توانایی بیشتر این ژنوتیپ در حفظ بقاء در شرایط تنش باشد.

ارتفاع بوته تحت تأثیر برهمکنش ژنوتیپ و دماهای یخ‌زدگی قرار گرفت (جدول ۶). کاهش دما به ۲۰- درجه سانتی‌گراد سبب مرگ تمامی ژنوتیپ‌ها شد و بوته زنده‌ای برای ثبت ارتفاع بوته وجود نداشت. کاهش دما از صفر به ۱۵- و ۱۸- درجه سانتی‌گراد سبب کاهش ارتفاع بوته در بیشتر ژنوتیپ‌ها شد. با وجود اینکه کمترین کاهش ارتفاع بوته در نتیجه کاهش ۱۸ درجه‌ای دما در ژنوتیپ MLC11 (کاهش ۲۲ درصد) مشاهده شد، اما در این ژنوتیپ بین ارتفاع بوته در دمای صفر با دماهای ۱۵- و ۱۸- درجه سانتی‌گراد تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد.

جدول ۶- تاثیر دمای یخزدگی بر ارتفاع و وزن خشک ژنوتیپ‌های عدس پس از اعمال یخزدگی در شرایط کنترل‌شده

Table 6. Effect of freezing temperature on plant height and dry weight of lentil genotypes after freezing under controlled conditions

ژنوتیپ	ارتفاع بوته (سانتی‌متر) Plant Height (cm)				زیست‌توده (میلی گرم در بوته) Biomass (mg.plant^{-1})			
	دمای یخزدگی Freezing temperature (ºC)				دمای یخزدگی Freezing temperature (ºC)			
Genotype	0	-15	-18	-20	0	-15	-18	-20
[1]MLC8	19.8^{a}	13.4^{a-h}	3.83^{j-p}	0.00^{p}	204^{b-j}	144^{h-p}	45^{r-w}	0.00^{w}
MLC11	20.5^{a}	17.5^{a-c}	16.8^{a-d}	0.00^{p}	293^{a}	232^{a-g}	124^{j-r}	0.00^{w}
MLC13	15.0^{a-g}	14.7^{a-g}	1.11^{o-p}	0.00^{p}	119^{j-s}	199^{c-k}	22.7^{u-w}	0.00^{w}
MLC17	16.0^{a-f}	11.8^{b-i}	1.33^{np}	0.00^{p}	286^{a-c}	270^{a-d}	10.7^{vw}	0.00^{w}
MLC33	15.1^{a-g}	11.2^{c-j}	2.00^{m-p}	0.00^{p}	150^{g-o}	146^{g-p}	22.7^{u-w}	0.00^{w}
MLC38	8.33^{g-o}	5.33^{i-p}	0.00^{p}	0.00^{p}	73.5^{n-w}	32.7^{s-w}	0.00^{w}	0.00^{w}
MLC47	16.4^{a-e}	$14.\ 7^{a-h}$	9.22^{e-m}	0.00^{p}	178^{e-m}	154^{g-n}	179^{e-m}	0.00^{w}
MLC70	$18.\ 7^{ab}$	16.0^{a-f}	1.33^{np}	0.00^{p}	168^{f-m}	193^{d-l}	11.7^{vw}	0.00^{w}
MLC84	16.2^{a-e}	5.06^{i-p}	3.96^{j-p}	0.00^{p}	158^{g-n}	42.0^{r-w}	39.7^{r-w}	0.00^{w}
MLC103	11.9^{b-i}	5.31^{i-p}	1.50^{np}	0.00^{p}	110^{l-t}	20.3^{vw}	16.0^{vw}	0.00^{w}
MLC286	14.7^{a-h}	8.61^{f-n}	4.50^{i-p}	0.00^{p}	110^{l-u}	132^{i-q}	28.0^{t-w}	0.00^{w}
MLC303	11.7^{b-i}	13.8^{a-h}	1.00^{o-p}	0.00^{p}	162^{g-m}	162^{g-m}	13.0^{vw}	0.00^{w}
MLC334	15.5^{a-g}	10.7^{c-k}	4.10^{j-p}	0.00^{p}	250^{a-f}	116^{k-s}	65.0^{o-w}	0.00^{w}
MLC407	14.7^{a-h}	15.8^{a-f}	3.39^{k-p}	0.00^{p}	218^{a-i}	158^{g-n}	40.0^{r-w}	0.00^{w}
MLC409	9.83^{d-l}	9.67^{d-l}	4.67^{i-p}	0.00^{p}	50.0^{q-w}	94.0^{m-v}	55.3^{q-w}	0.00^{w}
MLC454	17.3^{a-c}	14.2^{a-h}	3.61^{k-p}	0.00^{p}	215^{a-i}	291^{ab}	52.7^{q-w}	0.00^{w}
MLC469	17.5^{a-c}	7.21^{h-p}	2.89^{l-p}	0.00^{p}	222^{a-h}	49^{q-w}	61.7^{p-w}	0.00^{w}
MLC472	17.4^{a-c}	15.7^{a-g}	0.00^{p}	0.00^{p}	256^{a-e}	225^{a-h}	0.00^{w}	0.00^{w}
$LSD_{(0.05)}$		3.35				39.1		
منابع تغییر S.O.V	درجه آزادی df				میانگین مربعات Mean squares			
ژنوتیپ Genotype(G)	17	58.6^{**}			16437^{**}			
دما Temperature (T)	3	2711^{**}			386884^{**}			
ژنوتیپ× دما G×T	51	22.8^{**}			7831^{**}			
خطا Error	144	4.30			586			
C.V (%)	-	27.0			26.1			

۱- MLC: کلکسیون عدس مشهد. LSD حداقل تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد. **: معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد، C.V: ضریب تغییرات.

MLC: Mashhad Lentil Collection. LSD: Least significant difference, at level of 0.05. **: Significant (P≤ 0.01), C.V: Coefficient Variation.

در هفت ژنوتیپ (MLC8، MLC17، MLC84، MLC103، MLC286، MLC334 و MLC469) کاهش دما از صفر به ۱۵- درجه سانتی‌گراد سبب کاهش معنی‌دار ارتفاع بوته شد و در سایر ژنوتیپ‌ها تفاوتی ازلحاظ ارتفاع بوته بین دماهای صفر و ۱۵- درجه سانتی‌گراد وجود نداشت. به‌عبارتی این ژنوتیپ‌ها از توانایی مناسبی جهت حفظ و یا افزایش ارتفاع خود در دوره بازیافت برخوردار بودند. بیشترین کاهش ارتفاع بوته درنتیجه کاهش دما از صفر به ۱۸- درجه سانتی‌گراد در ژنوتیپ MLC70 و به میزان ۱۴/۱ برابر مشاهده شد (جدول ۶).

برهمکنش دما و ژنوتیپ بر میزان زیست‌توده در پایان دوره بازیافت معنی‌دار بود کاهش دما به ۱۸- درجه سانتی‌گراد به جز در دو ژنوتیپ MLC47 و MLC409 در سایر ژنوتیپ‌ها سبب کاهش میزان زیست‌توده شد. بیشترین درصد کاهش وزن خشک نسبت به دمای صفر درجه سانتی‌گراد (کاهش ۱۴/۴ برابری) نیز مانند ارتفاع بوته متعلق به ژنوتیپ MLC70 بود (جدول ۵). تولید ماده خشک در گیاه در طی دوران بازیافت به توانایی آن به مقابله با تنش سرما بستگی دارد؛ بنابراین هر ژنوتیپی که بتواند در مقابله با تنش از بقای بالاتری برخوردار باشد، از رشد مجدد مناسب‌تری در انتهای فصل رشد برخوردار خواهد بود. وجود همبستگی مثبت و معنی‌دار بین درصد بقاء با ارتفاع بوته (r^2=۰/۸۰**) و زیست‌توده (r^2=۰/۷۰**) در پایان دوره بازیافت نیز نشان دهنده این مطلب می‌باشد (جدول ۶). تجمع گونه‌های فعال اکسیژن در کلروپلاست‌ها تحت تنش، سبب کاهش محتوای کلروفیل و تحریک بازدارندگی نوری و کاهش فتوسنتز می‌شود که درنتیجه آن میزان وزن خشک گیاه کاهش می‌یابد (Soengas *et al.*, 2018).

تجزیه به عامل‌ها: ضرایب عامل‌ها بر مبنای تجزیه به مؤلفه‌های اصلی نشان داد که عامل اول حدود ۳۱/۱۲ درصد از تغییرات را توجیه کرد که شامل محتوای کلروفیل a، محتوای کاروتنوئیدها، نسبت Cha/Chb، محتوای کل رنگ‌دانه‌های فتوسنتزی و مهار فعالیت رادیکال آزاد DPPH با بار منفی بود. عامل دوم حدود ۱۸/۲۸ درصد تغییرات را توجیه کرد که شامل محتوای کلروفیل b با بار منفی و فعالیت آنزیم پراکسیداز، ارتفاع بوته و زیست‌توده با بار مثبت بود. عامل سوم ۱۲/۲۷ درصد از تغییرات را توجیه کرد که شامل درصد بقا، محتوای پرولین و فعالیت آنزیم کاتالاز با بار مثبت بود. عامل چهارم ۹/۸۷ درصد از تغییرات را توجیه کرد که محتوای آنتوسیانین، محتوای فنول کل و محتوای مالون‌دی‌آلدئید با بار مثبت بیشترین تأثیر را در این عامل داشت. عامل پنجم ۶/۴۸ درصد از تغییرات را توجیه کرد که شامل کربوهیدارت‌های محلول با بار مثبت و پتانسیل اسمزی با بار منفی بود. عامل ششم ۶/۲۵ درصد از تغییرات را توجیه کرد که شامل محتوای نسبی آب برگ با بار منفی بود (جدول ۸).

با توجه به اینکه دو عامل اصلی اول و دوم بیشترین تغییرات واریانس داده‌ها را توجیه کردند (۴۹/۴۰ درصد) و صفات محتوای کلروفیل a، محتوای کلروفیل b، نسبت Cha/Chb، محتوای کاروتنوئیدها، محتوای کل رنگ‌دانه‌های فتوسنتزی، مهار فعالیت رادیکال آزاد DPPH فعالیت آنزیم پراکسیداز، ارتفاع بوته و زیست‌توده بیشترین تاثیر را در این دو عامل داشتند از این صفات برای به دست آوردن پراکنش و شناسایی ژنوتیپ‌های برتر در دستگاه مختصات استفاده شد (شکل ۲). همان‌طور که ملاحظه می‌شود ژنوتیپ‌های MLC8، MLC13، MLC17، MLC38، MLC84، MLC286 و MLC334 از نظر عامل‌های اول و دوم به‌عنوان ژنوتیپ‌های با تحمل بالا به تنش معرفی شدند (شکل ۲).

تجزیه خوشه‌ای: به‌منظور تعیین میزان قرابت ژنوتیپ‌ها و گروه‌بندی آن‌ها بر مبنای صفات موردبررسی، تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA و با استفاده از فاصله اقلیدسی انجام شد. نتایج تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌های موردمطالعه عدس، نشان‌دهنده قرارگیری آن‌ها در چهار گروه مجزا بود. به ترتیب ۹، ۶، ۲ و ۱ ژنوتیپ در گروه‌های اول تا چهارم قرار گرفتند (شکل ۳).

به‌منظور بررسی صحت گروه‌بندی‌های به‌دست‌آمده از روش تجزیه خوشه‌ای، از تابع تشخیص استفاده گردید (جدول ۹). نتایج تجزیه تابع تشخیص نشان داد که تمامی ژنوتیپ‌ها به‌طور صحیح گروه‌بندی شده‌اند و میزان موفقیت تابع تشخیص، در تمام گروه‌ها ۱۰۰ درصد بود.

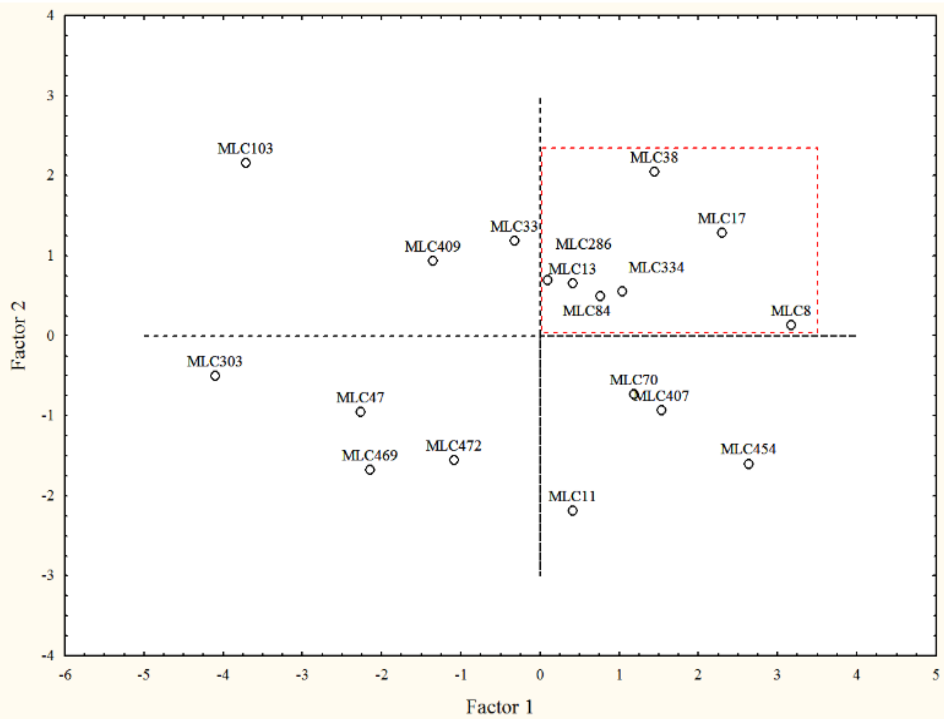
نتایج تجزیه تابع تشخیص کانونیکی نشان دادکه متغیر اول کانونیک که مقادیر ویژه بالاتری داشت، درمجموع ۹۹/۲ درصد واریانس موجود را تبیین کرده و که می‌تواند به‌عنوان معیاری مطمئن جهت انتساب ارقام جدید به گروه صحیح مورداستفاده قرار گیرد (جدول ۱۰). همبستگی کانونیکی بسیار معنی‌داری بین ژنوتیپ‌ها با اولین متغیر کانونیک (R=۰/۹۹**) نشان‌دهنده این است که متغیر کانونیک تفاوت بین ژنوتیپ‌ها را به‌خوبی توجیه می‌کنند (جدول ۱۰).

در معادله اول ضرایب استاندارد شده کانونیکی فعالیت آنزیم کاتالاز از تشخیص کانونیکی قابل‌توجه‌ای برخوردار است (جدول ۱۰). این نتایج نشان می‌دهد که این صفت بیشترین تأثیر را در تنوع بین ژنوتیپ‌ها دارند.

جدول ۸- تجزیه به عامل‌ها برای ژنوتیپ‌های عدس تحت تنش یخ زدگی

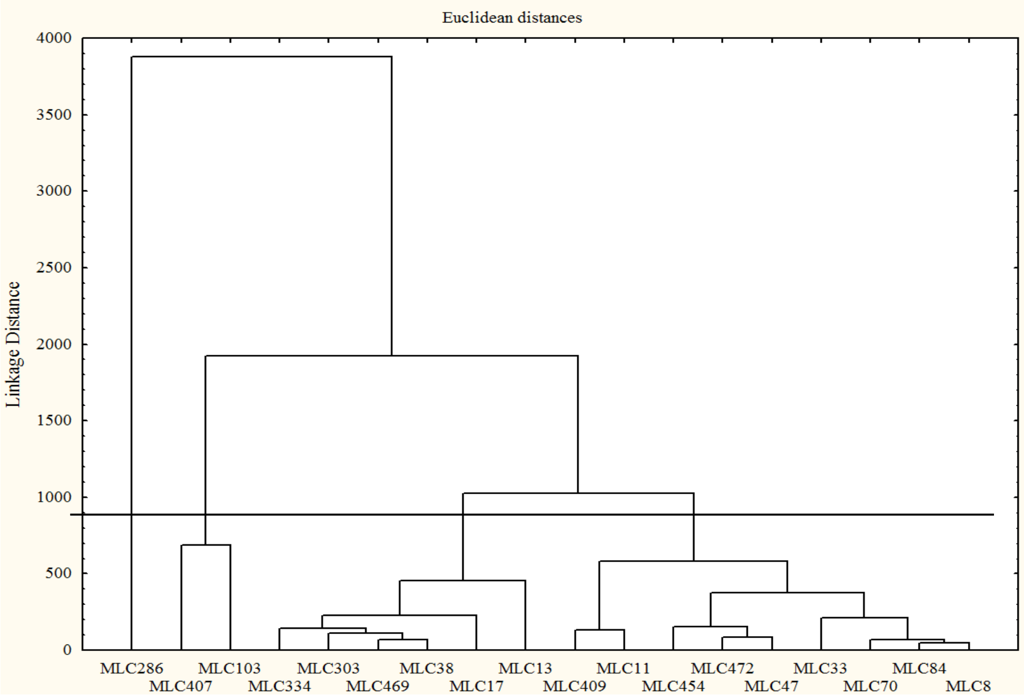
Table 8. Factor analysis for lentil genotypes under freezing stress

Traits	صفات	عامل اول Factor 1	عامل دوم Factor 2	عامل سوم Factor 3	عامل چهارم Factor 4	عامل پنجم Factor 5	عامل ششم Factor 6
Survival	بقا	-0.442	0.482	<u>0.599</u>	-0.072	0.194	-0.135
Cha	کلروفیل a	<u>-0.892</u>	-0.376	-0.058	-0.024	-0.109	0.088
Chb	کلروفیل b	-0.194	<u>-0.700</u>	0.200	0.227	0.018	-0.457
Carotenoids	کاروتنوئیدها	<u>-0.850</u>	-0.398	-0.212	-0.128	-0.004	-0.168
Cha/Chb	کلروفیلa/b	<u>-0.891</u>	-0.110	-0.137	-0.092	-0.115	0.310
Total pigment	کل رنگ‌دانه‌ها	<u>-0.864</u>	-0.466	-0.067	-0.018	-0.072	-0.054
DPPH	مهار فعالیت رادیکال آزاد	<u>-0.613</u>	0.304	0.246	0.460	-0.215	0.217
Anthocyanin	آنتوسیانین	0.212	0.377	-0.401	<u>0.497</u>	-0.325	-0.404
Phenol	فنول کل	-0.402	0.309	0.338	<u>0.501</u>	0.027	-0.163
Soluble carbohydrates	کربوهیدرات‌های محلول	0.424	-0.258	0.414	0.358	<u>0.551</u>	-0.113
MDA	مالون‌دی‌آلدئید	-0.450	0.159	-0.042	<u>0.697</u>	0.057	0.318
Proline	پرولین	0.488	0.258	<u>0.549</u>	-0.115	-0.332	-0.029
Catalase	کاتالاز	0.419	-0.382	<u>0.434</u>	-0.257	-0.377	0.187
Peroxidase	پراکسیداز	0.332	<u>0.603</u>	-0.512	0.108	-0.260	0.021
RWC	محتوای نسبی آب برگ	-0.464	0.296	-0.121	-0.254	-0.086	<u>-0.603</u>
Osmotic potential	پتانسیل اسمزی	0.075	-0.415	0.509	0.203	<u>-0.556</u>	-0.093
Plant height	ارتفاع بوته	-0.512	<u>0.636</u>	0.425	-0.233	0.065	0.017
Dry weight	زیست‌توده	-0.581	<u>0.613</u>	0.152	-0.344	-0.010	-0.045
Eigenvalue	مقادیر ویژه	5.60	3.29	2.21	1.78	1.17	1.12
Cumulative %	درصد سهم تجمعی	31.12	49.40	61.67	71.54	78.02	84.27



شکل ۲- پراکنش ژنوتیپ‌های عدس بر اساس دو عامل اصلی اول و دوم MLC: کلکسیون بذر عدس مشهد

Fig. 2. Distribution of lentil genotypes on the basis of the first and the second components. MLC: Mashhad Lentil Collection



شکل ۳-گروه‌بندی خوشه‌ای ژنوتیپ‌های عدس بر اساس صفات موردمطالعه تحت شرایط کنترل‌شده. MLC: کلکسیون بذر عدس مشهد

Fig. 3. Cluster grouping of lentil genotypes based on studied characteristic under controlled conditions (B). MLC: Mashhad Lentil Collection

جدول ۹- نتایج تابع تشخیص برای صحت گروه‌بندی ژنوتیپ‌های عدس در شرایط کنترل شده

Table 9.The results of discriminant function for clustering validity of lentil genotypes under controlled conditions

Group		Group Membership اعضای گروه				Total جمع کل
		1	2	3	4	
مجموع Total	1	9	0	0	0	9
	2	0	6	0	0	6
	3	0	0	2	0	2
	4	0	0	0	1	1
درصد Pecentage	1	100	0	0	0	100
	2	0	100	0	0	100
	3	0	0	100	0	100
	4	0	0	0	100	100

۱۰۰٪ گروه‌ها به درستی گروه‌بندی شدند

100% of original grouped cases correctly classified.

در ادامه از متغیر کانونیکی معنی‌دار اول برای گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها استفاده شد (شکل ۵). با توجه به شکل (۵) ژنوتیپ‌های عدس در چهار گروه گروه‌بندی شدند و در هر گروه تنوع ژنتیکی درون‌گروهی کمی نسبت به تنوع ژنتیکی بین گروهی مشاهده شد.

همان‌طور که در کل مشاهده می‌شود کمترین فاصله بین گروه‌های اول و دوم و بیشترین فاصله بین گروه‌های اول و چهارم مشاهده گردید (شکل ۴). درواقع ژنوتیپ‌های هر گروه فاصله ژنتیکی کمی با یکدیگر دارند. با توجه به اینکه گروه‌های اول و دوم فاصله ژنتیکی کمی با یکدیگر دارند می‌توان از آن‌ها در برنامه‌های بهنژادی به‌منظور ایجاد ژنوتیپ‌های جدید و به‌گزینی برای تحمل به یخزدگی استفاده کرد.

در گروه‌های تعیین شده برای هر یک از صفات موردمطالعه به‌صورت جداگانه تجزیه واریانس یک‌طرفه انجام شد (جدول ۱۰). بر اساس نتایج تجزیه واریانس تنها از نظر فعالیت آنزیم کاتالاز و محتوای نسب آب برگ بین گروه‌ها تفاوت معنی‌داری مشاهده شد (جدول ۱۱).

جدول ۱۰- ضرایب استاندارد کانونیکی صفات اندازه‌گیری شده در ژنوتیپ‌های عدس

Table 10. Standardized canonical discriminant function coefficients measured groups in lentil genotypes under salinity stress

Traits	صفات	متغیرهای کانونیکی(Canonical varieties)		
		1	2	3
Survival	بقا	-0.942	0.562	0.469*
Cha	کلروفیل a	-9.438	1.433	-1.293*
Chb	کلروفیل b	6.074	2.138	1.162*
Cartenoieds	کاروتنوئیدها	3.075	2.283*	-0.208
Cha/Chb	کلروفیلa/b	7.050	2.272*	-0.497
Total pigment	کل رنگ‌دانه‌ها	0.955	-6.942	0.711*
DPPH	مهار فعالیت رادیکال آزاد	-5.070	2.206	-0.366*
Antocyanin	آنتوسیانین	-7.331	2.447*	0.166
Phenol	فنول کل	5.736	-1.492	0.633*
Soluble Carbohydrate	کربوهیدرات‌های محلول	-3.145	0.222*	-1.029
MDA	مالون‌دی‌آلدئید	2.108	-1.789	0.199*
Proline	پرولین	3.877	-1.218*	0.186
Catalase	کاتالاز	3.447*	0.110	0.045
Peroxidase	پراکسیداز	5.247	-0.794*	-0.040
Eigenvalue	ویژه مقادیر	227	1.229	0.689
Cumulative %	تجمعی سهم درصد	99.2	99.7	100
Canonical Correlation	کانونیکی همبستگی	0.998**	0.743*	0.639*

*: بالاترین همبستگی مشاهده شده بین هر صفت و متغیر کانونیکی

*: Largest absolute correlation between each variable and any discriminant function

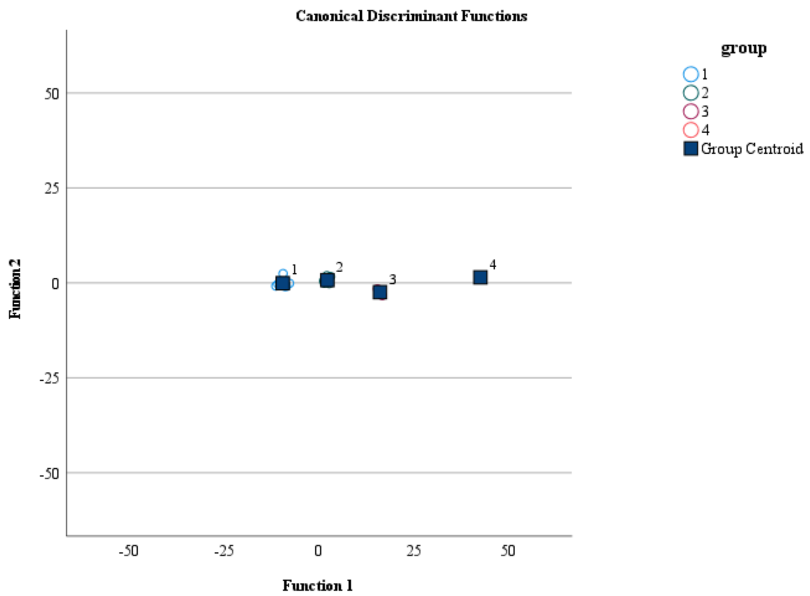
جدول ۱۱- تجزیه واریانس (میانگین مربعات) گروه‌ها بر اساس صفات مورد مطالعه عدس در شرایط کنترل شده

Table 11. Analysis of variance (mean square) based on measured groups in lentil genotypes under controlled conditions

Traits	صفات	Between Groups بین گروه‌ها	Within Groups داخل گروه‌ها
df	درجه آزادی	3	14
Survival	بقا	98.0^{ns}	73.0^{ns}
Cha	کلروفیل a	0.001^{ns}	0.005^{ns}
Chb	کلروفیل b	0.000^{ns}	0.000^{ns}
Cartenoieds	کاروتنوئیدها	0.001^{ns}	0.001^{ns}
Cha/Chb	کلروفیلa/b	0.015^{ns}	0.047^{ns}
Total pigment	کل رنگ‌دانه‌ها	0.004^{ns}	0.011^{ns}
DPPH	مهار فعالیت رادیکال آزاد	0.017^{ns}	0.032^{ns}
Antocyanin	آنتوسیانین	0.339^{ns}	0.198^{ns}
Phenol	فنول کل	403^{ns}	611^{ns}
Soluble Carbohydrate	کربوهیدرات‌های محلول	0.196^{ns}	0.369^{ns}
MDA	مالون‌دی‌آلدئید	3483^{ns}	2045^{ns}
Prolin	پرولین	1.094^{ns}	1.451^{ns}
Catalase	کاتالاز	8148805^{**}	86652^{**}
Peroxidase	پراکسیداز	2.96^{ns}	7.11^{ns}
RWC	محتوای نسبی آب برگ	182^{**}	49.3^{**}
Osmotic Potential	پتانسیل اسمزی	0.327^{ns}	0.141^{ns}
Plant Height	ارتفاع بوته	6.65^{ns}	4.50^{ns}
Dry Weight	زیست‌توده	935^{ns}	1463^{ns}

* و ** به ترتیب معنی دار در سطوح احتمال پنج و یک درصد

* and **: probability levels of 5% and 1%, respectively.



شکل ۵- گروه‌بندی ژنوتیپ‌های عدس بر اساس متغیرهای کانونیک معنی‌دار در شرایط کنترل شده.

Fig. 5. Cluster grouping of lentil genotypes based on significant canonical variable under controlled conditions.

جدول ۱۲- میانگین و انحراف از میانگین گروه‌های حاصل از تجزیه خوشه‌ای برای صفات موردمطالعه در ژنوتیپ‌های عدس تحت شرایط کنترل‌شده

Table 12. Mean and deviation from mean of groups in cluster analysis for traits in Lentil genotypes under controlled conditions

Traits	گروه Group							
	1		2		3		4	
	MLC8, MLC84, MLC70, MLC33, MLC47, MLC472, MLC454, MLC11, MLC409		MLC13, MLC17, MLC38, MLC469, MLC303, MLC334		MLC103, MLC407		MLC286	
صفات	S	T	S	T	S	T	S	T
A	50.8	3.84	42.8	-4.09	41.5	-5.47	47.8	0.907
B	0.465	0.008	0.453	-0.003	0.426	-0.030	0.463	0.006
C	0.253	0.004	0.242	-0.007	0.248	-0.001	0.256	0.007
D	0.130	0.002	0.134	0.006	0.104	-0.024	0.119	-0.009
E	1.87	0.028	1.85	0.009	1.71	-0.135	1.81	-0.037
F	0.853	0.020	0.820	-0.012	0.778	-0.055	0.838	0.005
G	0.958	0.048	0.861	-0.049	0.827	-0.083	0.942	0.032
H	1.69	0.125	1.62	0.054	0.922	-0.645	1.40	-0.165
I	135	6.693	125	-3.33	109	-19.2	126	-1.93
J	2.14	-0.031	2.08	-0.092	2.67	0.500	2.00	-0.170
K	134	23.6	90.9	-19.4	81.3	-28.9	71.5	-38.7
L	4.39	-0.217	4.47	-0.139	5.37	0.761	5.87	1.26
M	1266	-849	2285	170	3594	1479	5777	3662
N	5.49	0.116	5.95	0.576	3.92	-1.46	3.78	-1.59
O	70.6	-0.333	76.8	5.82	61.0	-9.96	59.0	-12.0
P	2.35	-0.025	2.20	-0.175	2.60	0.221	3.21	0.832
Q	8.72	1.05	6.59	-1.09	6.58	-1.10	6.94	-0.731
R	103	10.8	88.1	-4.56	70.3	-22.3	67.5	-25.2

MLC: کلکسیون عدس مشهد، A: بقا (٪)، B: کلروفیل a (میلی‌گرم بر گرم وزن تر)، C: کلروفیل b (میلی‌گرم بر گرم وزن تر)، D: کاروتنوئیدها (میلی‌گرم بر گرم وزن تر)، E: نسبت کلروفیلa به کلروفیل b، F: کل رنگ‌دانه‌ها (میلی‌گرم بر گرم وزن تر)، G: مهار فعالیت رادیکال آزاد DPPH (میلی‌گرم بر گرم وزن تر)، H: آنتوسیانین (میلی مول ر گرم وزن تر)، I: فنول کل (میلی‌گرم بر گرم وزن تر)، J: کربوهیدرات‌های محلول (میلی‌گرم بر گرم وزن تر)، K: مالون‌دی‌آلدئید (نانومول بر گرم وزن تر)، L: پرولین (میلی‌گرم بر گرم وزن تر)، M: کاتالاز (واحد در دقیقه در گرم وزن تر)، N: پراکسیداز (واحد در دقیقه در گرم وزن تر)، P: محتوای نسبی آب برگ (٪)، Q: پتانسیل اسمزی (مگاپاسکال)، R: زیست‌توده (میلی‌گرم در بوته)، S: میانگین گروه ، T: اختلاف از میانگین.

MLC: Mashhad Lentil Collection, A: Survival (%), B: Chlorophyll a ($mg.gfw^{-1}$), C: Chlorophyll b ($mg.gfw^{-1}$), D: Carotenoieds ($mg.gfw^{-1}$), E: Cha/Chb, F: Total pigments ($mg.gfw^{-1}$), G: DPPH ($mg.gfw^{-1}$), H: Anthocyanin ($mmol.gfw^{-1}$), I: Phenol ($mg.gfw^{-1}$), J: Soluble carbohydrates ($mg.gfw^{-1}$), K: MDA ($nm.gfw^{-1}$), L: Proline ($mg.gfw^{-1}$), M: Catalase (unit min gfw^{-1}), N: Peroxidase (unit min gfw^{-1}), O: RWC (%), P: Osmotic potential (MPa), Q: Plant height (cm), R: Dry weight ($mg.plant^{-1}$) S: Group mean, T: Deviation from mean.

مقایسه میانگین گروه‌ها با میانگین کل نشان داد که تمامی صفات به جز محتوای کربوهیدرات‌های محلول، محتوای پرولین، محتوای نسبی آب برگ، فعالیت آنزیم کاتالاز و پتانسیل اسمزی در گروه اول نسبت به میانگین کل برتری داشت. ژنوتیپ‌های متعلق به گروه اول شامل MLC8، MLC11، MLC33، MLC47، MLC70، MLC84، MLC409، MLC454 و MLC472 بودند از این ژنوتیپ‌ها به دلیل برتری از نظر درصد بقاء می‌توان در مطالعات تکمیلی استفاده نمود (جدول ۱۲). نتایج حاصل از درصد بقاء نیز نشان دهنده تحمل دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد در این ژنوتیپ‌ها می‌باشد (جدول‌های ۲ و ۱۲).

نتیجه‌گیری

بین ژنوتیپ‌های موردمطالعه ازلحاظ درصد بقاء، رشد مجدد و صفات آنتی‌اکسیدانی تفاوت قابل ملاحظه‌ای مشاهده شد. نتایج خوشه‌بندی و مقایسه میانگین گروه‌ها نیز نشان دهنده تحمل به سرمای مناسب‌تر در ژنوتیپ‌های متعلق به گروه اول بود. ژنوتیپ‌های متعلق به گروه اول در بیشتر صفات موردمطالعه از برتری نسبت به میانگین کل برخوردار بودند. ژنوتیپ‌های متعلق به گروه دوم و سوم از میانگین درصد بقای کمتری نسبت به میانگین کل برخوردار بودند، که نشان دهنده پرا حساسیت بیشتر آن‌ها به تنش بود.. با توجه به اجرای این پژوهش در شرایط کنترل شده و برتر بودن بیشتر صفات به‌ویژه درصد بقاء در ژنوتیپ‌های متعلق به گروه اول شامل MLC8، MLC11، MLC33، MLC47، MLC70، MLC84، MLC409، MLC454 و MLC472 انجام مطالعات تکمیلی روی این ژنوتیپ‌ها در شرایط مزرعه توصیه می‌شود.

منابع

1. Abe, N., Murata, T., and Hirota, A. 1998. Novel 1,1-diphenyl-2-picryhy- drazyl- radical scavengers, bisorbicillin and demethyltrichodimerol, from a fungus. Bioscience Biotechnology Biochemistry 62 (4): 61-662.
2. Ali, M.B., and McNear, D.H. 2014. Induced transcriptional profiling of phenylpropanoid pathway genes increased flavonoid and lignin content in Arabidopsis leaves in response to microbial products. BMC Plant Biology 14(1): 84.
3. Asghar, M.J., Hameed, A., Rizwan, M., Shahid, M., and Atif, R.M. 2021. Lentil wild genetic resource: A potential source of genetic improvement for biotic and abiotic stress tolerance. In: Wild Germplasm for Genetic Improvement in Crop Plants. Academic Press. p. 321-341.
4. Banerjee, A., and Roychoudhury, A. 2016. Plant responses to light stress: oxidative damages, photoprotection and role of phytohormones. In: G.J. Ahammed, J.Q. Yu, (Eds.). Plant Hormones Under Challenging Environmental Factors. Dordrecht, Netherlands: Springer. p. 181–213.
5. Banerjee, A., and Roychoudhury, A. 2018. Abiotic stress, generation of reactive oxygen species, and their consequences: an overview. In: V.P. Singh, S. Singh, D.Tripathi, *et al*. (Eds.). Revisiting the Role of Reactive Oxygen Species (ROS) in Plants: ROS Boon or Bane for Plants?. USA: Wiley. p.23–50
6. Banerjee, A., and Roychoudhury, A. 2019. Cold stress and photosynthesis. Photosynthesis, Productivity and Environmental Stress, USA: Wiley.
7. Bates, L. S., Waldren, R. P., and Teare, I. D. 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. Plant and Soil 39 (1): 205-207.
8. Choudhury, F. K., Rivero, R. M., Blumwald, E., and Mittler, R. 2017. Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination. Plant Journal 90 (5): 856–867.
9. Dere, S., Gines, T., and Sivaci, R. 1998. Spectrophotometric determination of chlorophyll a, b and total carotenoid contents of some algae species using different solvents. Turkish Journal of Botany 22 (1): 13-17.
10. Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., and Smith, F. 1951. A colorimetric method for the determination of sugars. Nature 168, 167.
11. Esteban, R., Moran, J.F., Becerril, J.M., and Garcia-Plazaola, J.I. 2015. Versatility of carotenoids: an integrated view on diversity, evolution, functional roles and environmental interactions. Environmental and Experimental Botany 119: 63–75.
12. Furtauer, L., Weiszmann, J., Weckwerth, W., and Nagele, T. 2019. Dynamics of plant metabolism during cold acclimation. International Journal of Molecular Science 20, 5411. 1-15.

13. Grusak, M.A. and Coyne, C.J. 2009. Variation for seed minerals and protein concentrations in diverse germplasm of lentil. In North America Pulse Improvement Association, 20th Biennial Meeting October 2009. USA p. 11.
14. Guo, X., Liu, D., and Chong, K. 2018. Cold signaling in plants: Insights into mechanisms and regulation. Journal of Integrative Plant Biology 60(9): 745-756.
15. Gururani, M. A., Venkatesh, J., and Tran, L.S.P. 2015. Regulation of photosynthesis during abiotic stress-induced photoinhibition. Molecular Plant 8(9): 1304-1320.
16. Hajihashemi, S., Noedoost, F., Geuns, J.M., Djalovic, I., and Siddique, K.H. 2018. Effects of cold stress on photosynthetic traits, carbohydrates, morphology and anatomy in nine cultivars of *Stevia rebaudiana*. Frontiers in Plant Science 9: 1430.
17. Heath, R.L., and Packer, L. 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Archives of Biochemistry and Biophysics 125 (1): 189-198.
18. Jia, K., Baz, L., and Al-Babili, S. 2017. From carotenoids to strigolactones. Journal of Experimental Botany 69 (9): 2189-2204.
19. Jovanovic, S.V., Kukavica, B., Vidovic, M., Morina, F., and Menckho, L. 2018. Class III peroxidases: Functions, localization and redox regulation of isoenzymes. In Antioxidants and Antioxidant Enzymes in Higher Plants; Gupta, D., Palma, J., Corpas, F., Eds.; Springer: Cham, Switzerland, p. 269-300.
20. Khaledian, Y., Maali-Amiri, R., and Talei, A. 2015. Phenylpropanoid and antioxidant changes in chickpea plants during cold stress. Russian Journal of Plant Physiology 62 (6): 772-778.
21. Kosova, K., Vitamvas, P., Urban, M.O., Prasil, I.T., and Renaut, J. 2018. Plant abiotic stress proteomics: The major factors determining alterations in cellular proteome. Frontiers in Plant Science 9, 122.
22. Kuai, B., Chen, J., and Hortensteiner, S. 2018. The biochemistry and molecular biology of chlorophyll breakdown. Journal of Experimental Botany 69 (4): 751–767.
23. Lei, Y., Shah, T., Yong, Ch., Yan, L., Xue-kun, Zh., and Xi-ling, Z. 2019. Physiological and molecular responses to cold stress in rapeseed (*Brassica napus* L.). Journal of Integrative Agriculture 18 (12): 2742–2752.
24. Lin, D., Kong, R., Chen, L., Wang, Y., Wu, L., Xu, J., Piao, Zh., Lee, G., and Dong, Y. 2020. Chloroplast development at low temperature requires the pseudouridine synthase gene *TCD3* in rice. Scientific Reports 10: 8515. 1-12.
25. Lin, D., Xiao, M., Zhao, J., Li, Z., Xing, B., and Li, X. 2016. An overview of plant phenolic compounds and their importance in human nutrition and management of type 2 diabetes. Molecules 21, 1374.
26. Liu, W., Yu, K., He, T., Li, F., Zhang, D., and Liu, J. 2013. The low temperature induced physiological responses of *Avena nuda* L., a cold-tolerant plant species. The Scientific World Journal 1-7.
27. Liu, Y., Tikunov, Y., Schouten, R.E., Marcelis, L.F.M., Visser, R.G.F., and Bovy, A. 2018. Anthocyanin biosynthesis and degradation mechanisms in solanaceous vegetables: a review. Frontiers in Chemistry 6: 52.
28. Liu, Z., Jia, Y., Ding, Y., Shi, Y., Li, Z., Guo, Y., Gong, Z., and Yang, S. 2017. Plasma membrane CRPK1-mediated phosphorylation of 14-3-3 proteins induces their nuclear import to fine-tune CBF signaling during cold response. Molecular Cell 66 (1): 117–128.
29. Murray, G.A., Eser, D., Gusta, L.V. and Eteve, G., 1988. Winterhardiness in pea, lentil, faba bean and chickpea. In World Crops: Cool Season Food Legumes p. 831-843. Springer, Dordrecht.
30. Nabati, J., Nezami, A., Mirmiran, S.M., Hasanfard, A., Hojjat, S.S., and Bagheri, A. 2020b. Freezing tolerance in some lentil genotypes under controlled conditions. Seed and Plant Journal. 36 (2): 183-205. [In Persian with English Summary]
31. Nabati, J., Nezami, A., Mirmiran, S.M., and Hojjat, S.S. 2020a. Evaluation of freezing tolerance of selected lentil (*Lens culinaris* Medik.) genotypes in feild conditions. Iranian Journal of Field Crop Science 51 (3): 89-101. (In Persian with English Summary).
32. Naing, A.H., Ai, T.N., Lim, K.B., Lee, I.J., and Kim, C.K. 2018. Overexpression of *Rosea1* from snapdragon enhances anthocyanin accumulation and abiotic stress tolerance in transgenic tobacco. Frontiers in Plant Science 9: 1070.
33. Paldi, K., Racz, I., Szigeti, Z., and Rudnoy, S. 2014. S_methylmethionine alleviates the cold stress by protection of the photosynthetic apparatus and stimulation of the phenylpropanoid pathway. Biologia Plantarum 58 (1): 189–194.
34. Raja, V., Majeed, U., Kang, H., Andrabi, K.I., and John, R. 2017. Abiotic stress: Interplay between ROS, hormones and MAPKs. Environmental and Experimental Botany 137: 142–157.
35. Rezaie, R., Abdollahi Mandoulakani, B., and Fattahi, M. 2020. Cold stress changes antioxidant defense system, phenylpropanoid contents and expression of genes involved in their biosynthesis in *Ocimum basilicum* L. Scientific Reports 10: 5290. 1-10.

36. Sami, F., Yusuf, M., Faizan, M., Faraz, A., and Hayat, S. 2016. Role of sugars under abiotic stress. Plant Physiology and Biochemistry 109: 54-61.
37. Singleton, V.L., and Rossi, J.A. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. American journal of Enology and Viticulture 16(3): 144-158.
38. Sinha, R., Pal, A.K., and Singh, A.K. 2018. Physiological, biochemical and molecular responses of lentil (*Lens culinaris* Medik.) genotypes under drought stress. Indian Journal of Plant Physiology 23(4): 772-784.
39. Sirivibulkovit, K., Nouanthavong, S., and Sameenoi, Y. 2018. Paper-based DPPH assay for antioxidant activity analysis. Analytical Sciences. 34: 795-800.
40. Smart, R. E., and Bingham, G. E. 1974. Rapid estimates of relative water content. Plant physiology 53: 258-260.
41. Soengas, P., M.Rodriges, V., Velasco, P., and Caetea, M. E. 2018. Effect of temperature stress on antioxidant defenses in brassica oleracea. ACS Omega 3: 5237-5243.
42. Sreenivasulu, N., Ramanjulu, S., Ramachandra-Kini, K., Prakash, H., Shekar-Shetty, H., Savithri, H., and Sudhakar, C. 1999. Total peroxidase activity and peroxidase isoforms as modified by salt stress in two cultivars of fox-tail millet with differential salt tolerance. Plant Science 141(1): 1-9.
43. Szepesi, A., and Szollosi, R. 2018. Mechanism of Proline Biosynthesis and Role of Proline Metabolism Enzymes Under Environmental Stress in Plants. Plant Metabolites and Regulation Under Environmental Stress, Academic Press p. 337-353.
44. Tan, W.J., Yang, Y.C., Zhou, Y., Huang, L.P., Xu, L., Chen, Q.F., Yu, L.J., and Xiao, S. 2018. Diacylglycerol acyltransferase and Diacylglycerol kinase modulate triacylglycerol and phosphatidic acid production in the plant response to freezing stress. Plant Physiology 177 (3): 1303–1318.
45. Valizadeh-Kamran, R., Toorchi, M., Mogadam, M., Mohammadi, H., and Pessarakli, M. 2017. Effects of freeze and cold stress on certain physiological and biochemical traits in sensitive and tolerant barley (*Hordeum vulgare*) genotypes. Journal of Plant Nutrition 41 (1): 102-111.
46. Velikova, V., Yordanov, I., and Edreva, A. 2000. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants: protective role of exogenous polyamines. Plant Science 151(1): 59-66.
47. Wanger, G.J. 1979. Content and vacuole/ extra vacuole distribution of neutral sugars, free amino acids, and anthocyanin's in protoplast. Plant Physiology 64: 88-93.
48. Wisniewski, M., Glenn, D.M., and Fuller, M.P. 2002. Use of a hydrophobic particle film as a barrier to extrinsic ice nucleation in tomato plants. Journal of the American Society for Horticultural Science 127(3): 358-364.
49. Zhang, B., Liu, C., Wang, Y., Yao, X., Wang, F., and Wu, J. 2015. Disruption of a CAROTENOID CLEAVAGE DIOXYGENASE 4 gene converts flower colour from white to yellow in *Brassica* species. New Phytologist 206 (4): 1513-1526.
50. Zhao, Y., Han, Q., Ding, Ch., Huang, Y., Liao, J., Chen, T., Feng, Sh., Zhou, L., Zhang, Zh., Chen, Y., Yuan, Sh., and Yuan, M. 2020. Effect of low temperature on chlorophyll biosynthesis and chloroplast biogenesis of rice seedlings during greening. International Journal of Molecular Science 21: 1-22.
51. Zhou, Q., Luo, D., Chai, X., Wu, Y., Wang, Y., Nan, Zh., Yang, Q., Liu, W., and Liu, Zh. 2018. Multiple regulatory networks are activated during cold stress in *Medicago sativa* L. International Journal of Molecular Science 19: 3169. 1-18.

Iranian Journal of Pulses Research
Homepage: **https://ijpr.um.ac.ir**
Vol. 14, No. 1, June 2023, p. 92-111 (Original Research Article)

Evaluation of diversity of lentil (*Lens culinaris* Medik.) genotypes under freezing stress in controlled conditions

Nabati[1*], Jafar; Nezami[2], Ahmad; Mirmiran[3], Seyyedeh Mahboobeh; Mohammadi[4], Mohammad; Hasanfard[5], Alireza

1. Assistant Professor, Crop Physiology, Department of Legume, Research Center for Plant Sciences, Ferdowsi University of Mashhad; jafarnabati@ferdowsi.um.ac.ir
2. Professor, Crop Physiology, Department of Agronomy, Faculty of Agriculture and Research Center for Plant Sciences, Ferdowsi University of Mashhad; nezami@um.ac.ir
3. Assistant Professor, Crop Physiology, Khorasan-e-Razavi Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Mashhad, Iran; mmirmiran@yahoo.com
4. MSc. in Seed Technology, Department of Agrotechnology, Faculty of Agriculture Ferdowsi University of Mashhad; m.mohammadi7698@gmail.com
5. PhD. in Weed Science, Department of Agrotechnology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran; alireza.hasanfard@yahoo.com

The Dates:
Received: 15 August 2022; **Revised:** 4 November 2022
Accepted: 5 December 2022; **Available Online:** 22 June 2023

How to cite this article:
Nabati, J., Nezami, A., Mirmiran, S.M., Mohammadi, M., Hasanfard, A.R. 2023. Evaluation of diversity of lentil (*Lens culinaris* Medik.) genotypes under freezing stress in controlled conditions. Iranian Journal of Pulses Research 14(1): 00-00. (In Persian with English abstract). DOI: 10.22067/ijpr.v14i1.2208-1042

Introduction

Lentil (*Lens culinaris* Medik.) is an important legume that plays a significant role in food security and human nutrition in the world. Lentils provide protein and fiber, as well as many vitamins and minerals, such as iron, zinc, folate, and magnesium. Lentil is a moderately drought tolerant crop, but the yield is drastically reduced with increased drought stress. One of the simplest ways to reduce the effects of drought stress is regulate plant growth period to avoid moisture stress; termed as drought escape; therefore, autumn planting can be effective in reducing the effects of drought stress in lentile. On the other hand, cold and freezing are the most important factor limiting lentil cultivation in autumn planting. Considering the importance of autumn planting in cold and highlands areas to use the seasonal rainfall in lentile crop and also due to the diversity among lentil genotypes for cold tolerance and the importance of lentil as a source of high nutritional value, this study was conducted to identify cold tolerant lentils genotypes.

Materials and Methods

This research was carried out in order to investigate the effective traits in freezing tolerance of lentil genotypes, as factorial based on Completely Randomized Design with three replications under controlled conditions at Ferdowsi University of Mashhad in 2020. The studied factors included 18 lentil genotypes at four freezing temperatures (0, -15, -18 and -20 °C). The pots were irrigated 24 hours before the freezing stress and then transferred to the thermogradient freezer to apply the tretments in mid-February. The freezer temperature at the beginning of the experiment was 5 °C and after placing the samples with slope of 2 °C per hour the temperature decreased. In order to create ice nucleation in the plant and to avoid the supercooling phenomenon, at 3 °C, Ice nucleation active bacteria (INAB) were sprayed on the plant. In order to balance the ambient temperature, seedlings were kept in each temperature treatment for one hour and then overnight in a cold room at 5 °C. Before exposing the plant to freezing stress, photosynthetic pigments, DPPH radical activity, anthocyanin, total phenol, soluble carbohydrates, malondialdehyde (MDA), proline content, catalase activity, peroxidase activity, and the relative water content (RWC) of the osmotic potential were measured. Three weeks after transferring the samples to the greenhouse, the survival percentage of the samples were

* **Corresponding Author:** jafarnabati@ferdowsi.um.ac.ir

evaluated. Plant survival percentage was calculated by counting the number of live plants before and after frost stress in each pot.

Results and Discussion

The results showed that lowering the temperature to -18 and -20°C reduced the survival rate in most genotypes. The highest survival percentage was observed in MLC11 genotype at -18°C. None of the studied genotypes could withstand temperatures of -20°C. At -15°C, MLC13, MLC17, MLC70, MLC409 and MLC454 genotypes had a survival of over 80%. Factor analysis showed that the first factor accounted for 31.12% of the changes with chlorophyll a, carotenoids, Cha to Chb ratio, total photosynthetic pigments and inhibition of DPPH free radical activity and the second factor accounted for 18.28% of the changes with chlorophyll b, peroxidase, plant height and biomass justifies. Due to these traits, MLC8, MLC13, MLC17, MLC38, MLC84, MLC286 and MLC334 genotypes are considered as high stress tolerance genotypes. Analysis of genotype clusters and comparison of group means showed that all traits except soluble carbohydrates, proline, relative leaf water content, catalase and osmotic potential in the first group (MLC8, MLC11, MLC33, MLC47, MLC70, MLC84, MLC4, MLC409, MLC409) They were superior to the total average.

Conclusion

Significant variations were observed among the genotypes studied in terms of survival rate, regrowth, and antioxidant traits. Clustering and mean comparison analysis revealed that genotypes in the first group exhibited superior cold tolerance. These genotypes outperformed the overall average in most of the examined traits. On the other hand, genotypes in the second and third groups had lower mean survival rates compared to the overall mean, indicating their higher sensitivity to stress. The first group included genotypes MLC8, MLC11, MLC33, MLC47, MLC70, MLC84, MLC409, MLC454, and MLC472. Further investigations of these genotypes under field conditions are recommended to explore their potential and performance.

Keywords: Catalase، Cluster analysis، Osmotic potential، Proline، Soluble carbohydrates